BIBLIOTH. COLL. REG. MED. EDIN.

X. Fb 10.40

R38406

Digitized by the Internet Archive
in 2015

https://archive.org/details/b21980809

# LEHRBUCH
DER
ALLGEMEINEN UND SPECIELLEN
# PATHOLOGISCHEN ANATOMIE
FÜR STUDIRENDE UND ÄRZTE

VON

**Dr. ERNST ZIEGLER,**
PROFESSOR DER PATHOLOGISCHEN ANATOMIE UND DER ALLGEMEINEN PATHOLOGIE AN DER UNIVERSITÄT FREIBURG IN BADEN.

ZWEI BÄNDE.

## ERGÄNZUNGSHEFT.

TECHNIK DER HISTOLOGISCHEN UNTERSUCHUNG
PATHOLOGISCH-ANATOMISCHER PRÄPARATE
FÜR STUDIRENDE UND ÄRZTE

VON

**Dr. C. v. KAHLDEN,**
A. O. PROFESSOR UND I. ASSISTENT AM PATHOLOGISCHEN INSTITUT DER UNIVERSITÄT FREIBURG IN BADEN.

*VIERTE VERMEHRTE UND VERBESSERTE AUFLAGE.*

JENA
VERLAG VON GUSTAV FISCHER
1895.

# TECHNIK

DER

# HISTOLOGISCHEN UNTERSUCHUNG

## PATHOLOGISCH-ANATOMISCHER PRÄPARATE

FÜR STUDIRENDE UND ÄRZTE

ROYAL COLLEGE OF PHYSICIANS, EDINR. LIBRARY.

VON

Dr. C. v. KAHLDEN,
A. O. PROFESSOR UND I. ASSISTENT AM PATHOLOGISCHEN INSTITUT
DER UNIVERSITÄT FREIBURG IN BADEN.

*VIERTE VERMEHRTE UND VERBESSERTE AUFLAGE.*

JENA
VERLAG VON GUSTAV FISCHER
1895.

# Vorwort.

Die vorliegende Anleitung zur mikroskopischen Untersuchung pathologisch-anatomischer Präparate ist auf Anregung von Herrn Professor Ziegler entstanden. Sie ist in erster Linie dazu bestimmt, in erweiterter Form die „Technik der Histologischen Untersuchung Pathologisch-anatomischer Präparate“ zu ersetzen, welche den ersten drei Auflagen des Lehrbuches der pathologischen Anatomie von Ernst Ziegler beigegeben war, welche dann aber für die vierte und für die fünfte Auflage nicht wieder neu bearbeitet wurde. Dieselbe ist daher der vorliegenden Bearbeitung an zahlreichen Stellen zu Grunde gelegt.

Dem rein praktischen Zweck, dem das Buch dienen soll, entsprechend, sind die Namen von Autoren nur insoweit angeführt, als es zur kurzen Bezeichnung bestimmter Methoden wünschenswerth erschien.

Freiburg, im October 1889.

**v. Kahlden.**

---

# Vorwort zur zweiten Auflage.

Die zweite Auflage der „Technik“ hat an zahlreichen Stellen Zusätze und Erweiterungen erfahren. Es gilt das namentlich von den Abschnitten über Darstellung der Zelleinschlüsse, über Färbung der Bakterien, der thierischen Parasiten und vor Allem des Centralnervensystems. Das Capitel über Entkalkung ist vollständig umgearbeitet.

Freiburg, im December 1891.

**v. Kahlden.**

## Vorwort zur dritten Auflage.

In der vorliegenden dritten Auflage der „Technik“ sind namentlich die Capitel über Bakterienfärbung, über Färbung der Haut und des Centralnervensystems mit zahlreichen Zusätzen versehen worden. Das Capitel über die Untersuchung des Blutes ist entsprechend seiner immer mehr zunehmenden Wichtigkeit umgearbeitet und wesentlich erweitert worden.

Freiburg, im Juli 1893.

**v. Kahlden.**

## Vorwort zur vierten Auflage.

Die vierte Auflage der „Technik“ hat zahlreiche Zusätze und Erweiterungen erfahren, besonders in den Capiteln über Härtung der Präparate, Untersuchung der Haut und der Knochen. Neu eingefügt ist, mehrfach geäusserten Wünschen entsprechend, ein kurzer Abschnitt über das Bakterienculturverfahren, und dementsprechend sind in dem Capitel über die Färbung der pathogenen Bakterien auch deren wichtigste Cultureigenschaften angegeben. Von den früheren Auflagen der „Technik“ ist eine englische, italienische und russische Uebersetzung erschienen, eine französische in Vorbereitung.

Freiburg, im Juli 1895.

**v. Kahlden.**

# Inhaltsübersicht.


| | | Seite |
|---|---|---|
| I. Capitel. | Mikroskop und Utensilien | 1 |
| II. Capitel. | Untersuchung frischer pathologisch-anatomischer Präparate. Reagentien | 5 |
| III. Capitel. | Härtung von Präparaten | 9 |
| IV. Capitel. | Entkalkung | 14 |
| V. Capitel. | Die Einbettungsmethoden | 17 |
| VI. Capitel. | Injectionsverfahren | 22 |
| VII. Capitel. | Anfertigung und Aufbewahrung von Schnitten. Serienschnitte. Mikrotome | 24 |
| VIII. Capitel. | Behandlung mikroskopischer Präparate mit Reagentien und Färbemitteln | 30 |
| | 1) Allgemeines über Färbetechnik. Weiterbehandlung und Conservirung der Schnitte nach der Färbung | 31 |
| | 2) Die Kernfärbungen | 34 |
| | 3) Diffuse Färbung und Doppelfärbung | 40 |
| | 4) Färbung ganzer Stücke | 42 |
| | 5) Darstellung der Kerntheilungsfiguren | 43 |
| IX. Capitel. | Untersuchung degenerativer Veränderungen. | |
| | Nekrose | 47 |
| | Atrophie und Pigmentatrophie | 47 |
| | Trübe Schwellung | 48 |
| | Fettige Degeneration | 48 |
| | Schleimige Entartung | 49 |
| | Colloidentartung | 49 |
| | Amyloidentartung | 49 |
| | Hyaline Degeneration | 51 |
| | Glykogen | 51 |
| | Imprägnation mit Kalksalzen | 52 |
| | Pigmentbildung | 52 |

| | | Seite |
|---|---|---|
| X. Capitel. | Untersuchung wuchernder und entzündeter Gewebe . | 54 |
| XI. Capitel. | Untersuchung von Bakterien. | |
| | Untersuchung von Bakterien in Flüssigkeiten . | 57 |
| | Untersuchung von Bakterien in Schnitten . . . | 61 |
| | Schnittpräparate in Gelatineculturen . . . . | 64 |
| | Färbung der Sporen . . . . . | 65 |
| | Culturverfahren der Bakterien . . . . . | 66 |
| | Uebersicht über die Färbung der verschiedenen pathogenen Bakterien und über ihre wichtigsten Cultureigenschaften . . . . . | 70 |
| XII. Capitel. | Untersuchung von Schimmel- und Sprosspilzen . . | 85 |
| XIII. Capitel. | Untersuchung thierischer Parasiten . . . . . | 86 |
| XIV. Capitel. | Uebersicht über die Behandlung der einzelnen Gewebe und Organe zum Zweck mikroskopischer Untersuchung. | |
| | Untersuchung des Blutes . . . . . | 88 |
| | Untersuchung des Herzens und der Gefässe . . | 98 |
| | Untersuchung der Milz, des Knochenmarks und der Lymphdrüsen . . . . . | 98 |
| | Untersuchung der serösen Häute . . . . . | 99 |
| | Untersuchung der Haut . . . . . | 99 |
| | Untersuchung der Schleimhäute . . . . . | 102 |
| | Untersuchung von Darm und Darminhalt . . . | 102 |
| | Untersuchung von Leber und Pankreas . . . | 103 |
| | Untersuchung des Harnapparates und des Harns | 104 |
| | Untersuchung des Respirationsapparates und des Sputums . . . . . | 106 |
| | Untersuchung des Centralnervensystems . . . | 107 |
| | Untersuchung der peripheren Nerven und Ganglien | 120 |
| | Untersuchung des Sehorgans . . . . . | 121 |
| | Untersuchung des Gehörorgans . . . . . | 122 |
| | Untersuchung des Knochensystems . . . . | 122 |
| | Untersuchung der Muskeln und Sehnen, Sehnenscheiden und Schleimbeutel . . . . . | 124 |
| | Untersuchung des männlichen und des weiblichen Geschlechtsapparates . . . . . | 124 |
| XV. Capitel. | Mikroskopische Untersuchungen zu gerichtlichen Zwecken. | |
| | Untersuchung von Blutspuren . . . . . | 124 |
| | Untersuchung der Haare . . . . . | 126 |
| | Untersuchung der Samenflecken . . . . . | 127 |
| | Untersuchung von Deciduaresten . . . . . | 128 |

## Erstes Capitel.

# Mikroskope und Utensilien zur mikroskopischen Untersuchung.

Für den gewöhnlichen Gebrauch genügen ein oder zwei schwächere Objectivlinsen, und eine stärkere, die eine 300-fache Vergrösserung giebt. Ebenso reichen in der Regel zwei Oculare aus, ein schwächeres und ein stärkeres. Es ist im Allgemeinen Regel, das schwächere Ocular anzuwenden. Das Ocular giebt nämlich nur eine Vergrösserung von dem durch die Objectivlinse entworfenen Bilde, nicht von dem Präparat selbst. Etwaige Fehler, die also diesem Bilde anhaften, erscheinen bei dem stärkeren Ocular um so auffälliger. Ausserdem ist das Gesichtsfeld viel dunkler als bei dem schwachen Ocular.

Eine Ausnahme von dieser Regel machen die sog. Apochromaten, welche eine weitere Vergrösserung der Bilder mittels sehr starker Oculare ermöglichen, ohne dass die Bilder an Stärke verlieren.

Die meisten Mikroskope besitzen einen Hohl- und einen Planspiegel, welche das Licht auf das Präparat werfen. Man wendet in der Regel den Hohlspiegel an. Der Planspiegel eignet sich für die allerschwächsten Vergrösserungen.

Für die Untersuchung von Bakterien ist eine sog. Oelimmersionslinse [1]) wünschenswerth. Bei dem Gebrauch derselben bringt man zwischen die Linse und die obere Fläche des Deckglases einen Tropfen von einem Oel, oder einem Gemisch verschiedener Oele, welches dasselbe Brechungsvermögen hat wie das Glas, und durch welches die Luft mit ihrem von dem des Glases abweichenden Brechungscoefficienten ausgeschaltet wird.

Zur Entfernung des Immersionsöles von der Linse bedient man sich eines feinen Leinwandläppchens, welches mit Benzin befeuchtet ist. Von dem Deckglas entfernt man das Immersionsöl ebenso, zweckmässigerweise aber erst dann, wenn der Kanadabalsam fest geworden ist, und eine Verschiebung des Deckgläschens über dem Präparate nicht mehr möglich ist.

Feinere Verunreinigungen durch Staub entfernt man von den Ocularen und von den Objektivlinsen mit einem dünnen Leinwandläppchen oder einem zarten Haarpinsel. Bei gröberen und fester an-

---

[1]) Die früher gebräuchlichen Wasserimmersionen sind durch die viel besseren Oelimmersionen, welche allein zur Untersuchung von Bakterien geeignet sind, vollständig verdrängt.

haftenden Verunreinigungen wendet man ebenfalls wieder Benzin an, muss sich aber hüten, dass man nicht etwa den Kanadabalsam, mit dem die einzelnen Linsen des Objectives an einander befestigt sind, löst.

Durch Drehen des Oculars lässt sich leicht entscheiden, ob etwa vorhandene Verunreinigungen dem Ocular oder dem Objectiv anhaften.

Bei Anwendung von Oelimmersionen bedarf man noch eines Condensors, resp. eines Abbe'schen Beleuchtungsapparates, welcher durch eine Linse sämmtliche von dem Spiegel des Mikroskops ausgehenden Lichtstrahlen so sammelt, dass sie in einem Punkt vereinigt werden.

Wenn man auch nicht von vornherein sich ein Mikroskop mit Immersionslinse und Abbe'schem Beleuchtungsapparat anschafft, so thut man doch gut, bei der Wahl eines Stativs auf die Möglichkeit Rücksicht zu nehmen, dass sich später noch Immersion und Beleuchtungsapparat anbringen lassen. Bei Immersionslinsen ist namentlich die grobe Einstellung des Tubus mit der Hand mit mancherlei Unannehmlichkeiten verknüpft; sie wird durch ein Triebrad, wie es sich an den grösseren Stativen findet, wesentlich erleichtert.

Jedem, der sich ein Mikroskop anschaffen will, ist anzurathen, dass er sich bezüglich der Wahl der Firma, der Auswahl des Instruments und seiner Prüfung an ein pathologisches Institut wendet. Aus eigener Erfahrung kann ich die folgenden Firmen empfehlen:

E. Hartnack, Potsdam, Waisenstrasse 34.
E. Leitz, Wetzlar.
W. u. H. Seibert, Wetzlar.
C. Zeiss, Jena.

Alle diese optischen Werkstätten stellen Kataloge auf Verlangen gratis zur Verfügung.

Für die meisten Untersuchungen genügen die Objective III oder IV und VII von Hartnack, II und VII von Leitz, I, III und V$^{a}$ von Seibert, aa oder A, AA und E von Zeiss.

Unter den Immersionen sind die Immersionslinsen $^{1}/_{12}$ von Seibert oder von Zeiss respektive von den anderen Firmen am meisten zu empfehlen [1]).

Am besten bedient man sich zu mikroskopischen Untersuchungen des Tageslichts; grelles Sonnenlicht eignet sich gar nicht, auch das von blauem, unbewölktem Himmel stammende Licht ist seiner Farbe wegen nicht besonders zweckmässig. Am meisten empfiehlt es sich, das Licht von einer weissen, nicht zu stark von der Sonne beleuchteten Wolke zu nehmen.

An jedem Mikroskop befinden sich Vorrichtungen, um die Intensität des Lichtkegels, der vom Spiegel auf das Präparat geworfen wird, dadurch beliebig abzuschwächen, dass die Oeffnung in dem Objecttisch oder manchmal unter demselben verkleinert wird. Die einfachen Scheibenblendungen, die sich häufig noch an kleinen Mikroskopen befinden, sind weniger empfehlenswerth, weil sie nicht

---

[1]) Wegen der apochromatischen Mikroskope, deren allgemeiner Anwendung für die praktische Untersuchungen ihr sehr hoher Preis entgegensteht, sei auf die Kataloge verwiesen.

bis dicht an das Präparat herangebracht werden können, und weil sie das diffuse seitliche Licht nicht abzuhalten vermögen.

Durch den Mangel dieser Nachtheile zeichnen sich die Cylinderblendungen aus, die in einem Schlitten unter dem Objecttisch von der Seite her vorgeschoben werden können und, sobald sie in der Axe der Tischöffnung angelangt sind, nach oben bis dicht an das Präparat vorgerückt werden. Sehr empfehlenswerth sind die in Verbindung mit dem Abbe'schen Beleuchtungsapparat angewandten sog. Irisblenden, welche eine beliebige Abstufung der Lichtmenge durch einen einfachen Handgriff ermöglichen.

Je mehr Licht man auf ein Präparat einwirken lässt, deste mehr verschwinden die Structurverhältnisse desselben, weil die feineren Contouren in dem ad maximum durchsichtig gemachten Präparate unsichtbar werden. Daraus folgt, dass man für ungefärbte Präparate eine engere Blendung anwenden muss, während für gefärbte eine weitere am Platze ist.

Die stärkste Beleuchtung, die möglich ist: weite oder gar keine Blendung und dazu noch die Verstärkung des Lichts durch den Condensor, wendet man bei der Untersuchung gefärbter Bakterienpräparate an. Man erreicht dadurch, dass in dem Präparate die gefärbten Bakterien um so deutlicher hervortreten, weil das Structurbild, durch welches sie bei gewöhnlicher Beleuchtung leicht verdeckt werden, ganz oder fast ganz ausgeschaltet ist.

Ist man genöthigt, sich des künstlichen Lichts beim Mikroskopiren zu bedienen, so corrigirt man die mehr oder weniger gelbe Farbe desselben dadurch, dass man zwischen die Lichtquelle und den Spiegel des Mikroskops entweder eine blaue Glastafel, oder auch eine sogen. Schusterkugel einschaltet, d. h. eine Glaskugel, die mit einer durch Ammoniakzusatz blau gefärbter Lösung von schwefelsaurem Kupferoxyd gefüllt ist.

Ausserdem giebt es eine Reihe von eigens construirten Mikroskopirlampen.

Bei der von Kochs-Wolz (Bonn) construirten Lampe wird das Petroleum- oder Gaslicht von einem Reflector an eine bestimmte Stelle des über die Lampe gestülpten schwarzen Schornsteins reflectirt und von hier aus vermittels eines gebogenen Glasstabes direct bis unter das Object — mit Ausschaltung des Spiegels — geleitet. Zu erwähnen sind ausserdem noch:

Mikroskopirlampe von Hartnack in Potsdam für Gas und Petroleum.

Miskroskopirlampe von Dr. Lassar, für Petroleum, zu beziehen durch F. W. Dannhäuser, Leipzig, Weststrasse 12.

Von Nebenapparaten, die entweder die Handhabung des Miskroskops erleichtern, oder nur für gewisse Untersuchungen in Betracht kommen, sind zu nennen:

1) Ein sog. Revolverapparat, d. h. eine drehbare Scheibe, an der 2—5 Objectivlinsen angeschraubt werden können. Dadurch wird die schnelle Untersuchung ein und derselben Stelle, die sich sonst oft bei dem Wechseln der Objective verschiebt, der Reihe nach mit verschiedenen Vergrösserungen sehr erleichtert. In neuerer Zeit kommen auch schlittenartige Apparate zum Wechseln der Linsen in Gebrauch.

2) Ein Ocularmikrometer. Dasselbe stellt einen feinen, auf einer Glasplatte eingeritzten Maassstab dar, der sich in dem Ocular-

cylinder befindet. In diesen wird er entweder von der Seite eingeschoben oder, nachdem man die obere Linse des Ocularcylinders abgeschraubt hat, so eingesenkt, dass er auf einen in dem Cylinder befindlichen ringförmigen Vorsprung zu liegen kommt.

3) Ein Zeichenapparat, am besten die Camera von Abbe oder die von Seibert construirte. Durch dieselbe wird vermittels zweier Prismen ein Bild des mikroskopischen Präparats auf das in der Höhe des Objecttisches aufgelegte Zeichenpapier entworfen. Es wird dadurch die Herstellung der genauen Contouren des Präparats und seiner einzelnen Theile sehr erleichtert.

Im Uebrigen bedarf man zum Zeichnen eines kleinen Zeichentisches, dessen Platte mit dem Objecttisch in einer Höhe liegt.

Zum Zeichnen bedient man sich verschieden harter Bleistifte. Viele Zeichnungen lassen sich sehr gut mit der Feder und verschiedenfarbiger Tinte herstellen.

Heizbarer Objecttisch, Polarisationsapparat und Spectroskop kommen für die gewöhnlichen Untersuchungen nicht in Betracht.

Sehr empfehlenswerth für das Präpariren feinerer Objecte ist eine Lupe, die an einem Handgriff oder auch an einem Stativ befestigt ist.

## Sonstige Utensilien.

Die Objectträger sollen von weissem Glas sein. Am bequemsten ist das sog. englische Format. Dieselben werden mit Schutzleisten von Pappdeckel versehen, welche man mit syrupdicker, spirituöser Schellacklösung aufklebt, und deren vordere Fläche zur Bezeichnung des Präparats dient.

Die Deckgläschen dürfen im Allgemeinen nicht dicker als 0,16 mm sein. Man hält sich solche von verschiedener Grösse vorräthig, je nach der Grösse der einzulegenden Schnitte.

Objectträger und Deckgläschen werden durch Einlegen in eine Schale mit Spiritus und nachheriges Abtrocknen mit einem feinen Leinwandlappen gereinigt.

Ausserdem bedarf man einer Anzahl von Uhrschalen in verschiedenen Grössen, in denen das Färben, Auswaschen der Präparate etc. ausgeführt wird. Zum Aufbewahren von Schnittpräparaten, die nicht sofort eingelegt werden, dienen Glasdosen, die mit einem Deckel verschlossen werden können.

Schliesslich kommen noch Glasstäbe, Capillarröhren, Reagensgläser und Flaschen von verschiedener Grösse in Gebrauch.

Der Glasnadeln bedient man sich, wenn man mit Metalllösungen arbeitet.

Wenn man viele Schnitte auf einmal zu färben hat, so kann man sich dazu der Steinacher'schen Siebdosen (zu beziehen durch Siebert, Wien, Alsenstrasse) bedienen.

Dieselben bestehen aus einer Glasdose, deren Boden siebförmig durchlöchert ist, und die in eine oder der Reihe nach in mehrere äussere Dosen eingesetzt wird, so dass die auf dem Sieb aufliegenden Schnitte mit den verschiedenen Reagentien, welche man in die äusseren Dosen eingiesst, behandelt werden können.

Bezugsquellen für Glaswaaren sind:
S. König, Berlin, Dorotheenstrasse 35.
F. und M. Lautenschläger, Berlin, Ziegelstrasse.
Dr. Rohrbeck, Firma Z. F. Lume, Berlin.
W. P. Stender, Leipzig.

Von Metallinstrumenten kommen in Gebrauch: Präparirnadeln, Pincetten, Scheeren, Scalpells, Spatel etc.

Die Präparirnadeln müssen immer vollständig blank und frei von jeder Rauhigkeit sein, weil sonst feine Schnitte leicht an denselben hängen bleiben. Man kann die Präparirnadeln, wenn sie rauh geworden sind, auf feinem Glaspapier abschleifen und nachher auf einem Leder noch glätten. Am zweckmässigsten sind diejenigen Präparirnadeln, bei welchen die Nadel an einem Stiele angeschraubt und dementsprechend jedesmal, wenn sie schlecht geworden ist, durch eine neue ersetzt werden kann.

Sehr brauchbar ist ferner zu allen Manipulationen, zum Auffangen und Uebertragen von Schnitten, zum Entfernen der Schnitte von der Schneide des Mikrotommessers etc. eine silberne, biegsame, oben stumpfe Nadel.

Zum Uebertragen der Schnitte aus einer Flüssigkeit in die andere, namentlich von Wasser in Alkohol, sowie zum Ausbreiten derselben auf dem Objectträger dient dann ein Spatel. Am zweckmässigsten sind solche von dünnem Platinblech, die sich in allen beliebigen Grössen, auch so, dass sie für grössere Uebersichtsschnitte, z. B. des Centralnervensystems, ausreichen, herstellen lassen.

Von den dickeren Messingspateln lassen sich die Schnitte nicht so gut abziehen und ausbreiten. Ausserdem werden dieselben durch verschiedene Reagentien angegriffen.

---

## Zweites Capitel.

## Untersuchung frischer Präparate.

Bei der mikroskopischen **frischen Untersuchung von Geweben,** die entweder der Leiche oder dem Lebenden entnommen sind, wird das nöthige Untersuchungsmaterial in der Regel durch Zerzupfen gewonnen. Man excidirt mit der Pincette und einer kleinen über die Fläche gebogenen Scheere ein möglichst kleines Partikelchen und zerpupft dasselbe mittels zweier Präparirnadeln auf dem Objectträger in einem Tropfen Wasser oder 0,6-proc. Kochsalzlösung so lange, bis eine feinere Zertheilung nicht mehr möglich ist.

Die Kochsalzlösung hat vor dem Wasser den Vorzug, dass in ihr die Gewebe nicht so aufquellen, und dass auch die feineren Structurverhältnisse besser erhalten bleiben. Aehnliche Vortheile bieten seröse Flüssigkeiten, Blutserum, Hydrocele-Flüssigkeit etc.

Sogen. künstliches Serum kann man sich dadurch bereiten, dass man 9 Theile der Kochsalzlösung mit 1 Theil Hühnereiweiss versetzt. In einer derartigen Zusatzflüssigkeit verharren die Zellen länger in lebensfähigem Zustande.

Wenn es sich um Bakterienbefunde in frischen Präparaten handelt, so darf man niemals ausser Acht lassen, dass schon im destillirten

Wasser, noch mehr aber in der Kochsalzlösung Bakterienentwickelung stattfinden kann, und dass Bakterien, die sich im Präparat finden, eventuell auch aus der Zusatzflüssigkeit stammen können, namentlich wenn dieselbe nicht mehr frisch ist.

Für alle Zusatz- und Untersuchungsflüssigkeiten mikroskopischer Präparate gilt als Regel, dass man nur einen kleinen Tropfen davon auf den Objectträger bringt. Nimmt man zuviel Flüssigkeit, so liegt das Deckglas nicht fest auf und schwimmt entweder selbst weg, oder es gerathen wenigstens die einzelnen Zellen im Präparat in eine für die Untersuchung sehr störende Bewegung. Ausserdem hindert oder verlangsamt die Untersuchungsflüssigkeit, wenn sie in zu grosser Menge zugesetzt ist, die Einwirkung anderer Reagentien, die man etwa noch anwenden möchte.

Das Zerzupfungsverfahren kommt hauptsächlich zur Anwendung bei der Untersuchung von Muskeln, Gehirn, Rückenmark und bei denjenigen Geschwülsten, die ein reichlicheres Stroma besitzen. Bei der Untersuchung von Nerven und Muskeln müssen die excidirten Theilchen klein sein und dürfen nur kurze Abschnitte von Nerven- und Muskelfasern enthalten, weil längere Abschnitte sich sehr schwer trennen und zertheilen lassen.

Oft ist das Zerzupfen der frischen Präparate in Partikelchen, die klein und fein genug zur mikroskopischen Untersuchung sind, sehr schwierig. Man legt dann die Stückchen für 24 Stunden in eine sog. **Macerations-** oder **Isolationsflüssigkeit**. Nach dieser Zeit ist dann das Zerzupfen in feinste Theilchen leicht möglich.

Wenn man thierische Organstückchen mittels einer Isolationsmethode untersucht, so gilt als Regel, dass man die betreffenden Stückchen sofort nach der Tödtung des Thieres in die gewählte Isolationsflüssigkeit überträgt. Menschliche Organtheile sollen ebenfalls so frisch wie möglich der Einwirkung der Isolationsflüssigkeit ausgesetzt werden.

Man nimmt die Isolation in kleinen Uhrschälchen vor; das Volumen der Flüssigkeit darf das des Stückchens nicht zu sehr übersteigen, weil sonst mehr eine Härtung als eine Isolation erzielt wird.

Als Isolationsflüssigkeiten sind ausser vielen anderen, die sich mehr oder weniger bewährt haben, die folgenden zu empfehlen:

1) 33-proc. Alkohol, der sog. $^1/_3$-Alkohol von Ranvier, hergestellt durch Vermischen von 1 Theil 96-proc. Spiritus mit 2 Theilen Wasser.

2) Ganz dünne Chromsäurelösungen, 0,01—0,03-proc., sind für viele Fälle sehr geeignet.

3) 0,1-proc. Osmiumsäure, 12—24 Stunden lang zur Einwirkung gebracht, ermöglicht eine sehr gute Isolation und ist namentlich angezeigt, wenn es sich um verfettetes Gewebe handelt.

4) Methode von Arnold: das Stückchen kommt für 5—10 Minuten in 0,1-proc. Essigsäure, dann für 24—28 Stunden in 0,01-proc. Chromsäure. Nachbehandlung mit Pikrokarmin etc. ist möglich.

5) 33-proc. Kalilauge. In dieser zerfallen die Stückchen schon innerhalb einer Stunde. Ihre Anwendung empfiehlt sich namentlich bei der Untersuchung von glatten Muskelfasern, z. B. aus Tumoren des Uterus etc. Die Untersuchung muss ebenfalls in 33-proc. Kalilauge geschehen, weil bei Verdünnung derselben mit Wasser die Zellen zerstört werden (s. p. 8.).

6) Die Müller'sche Flüssigkeit (s. p. 10) ist ebenfalls zur Isolation, namentlich für Theile des Nervensystems sehr geeignet. Die Präparate verweilen in der Flüssigkeit 2—3 Tage.

Bei Anwendung der Isolationsflüssigkeit kann auch die Untersuchung in einem Tropfen derselben vorgenommen werden. Doch ist auch die Untersuchung in Wasser oder in Kochsalzlösung möglich.

Ausser durch Zerzupfen kann man sich zur frischen Untersuchung das Präparat auch so herstellen, dass man mit der Messerklinge über eine frisch hergestellte Schnittfläche des zu untersuchenden Organs hinstreicht und den so erhaltenen Gewebssaft, welcher an der Klinge haftet, in einem Tropfen Wasser oder Kochsalzlösung vertheilt. Man muss aber vorher durch sanftes Abstreichen, eventuell auch durch Abspülen das Blut von der Schnittfläche entfernen, weil sonst in dem Präparat die zahlreichen rothen Blutkörperchen alles Andere verdecken. Ausserdem muss man sich hüten, zu viel von der abgeschabten Masse auf den Objectträger zu bringen. Der Wassertropfen darf nur leicht getrübt werden. Anwendbar ist dieses Verfahren namentlich bei drüsigen Organen, speciell bei Leber und Niere, wenn es sich um die Frage handelt, ob deren Zellen körnig getrübt oder verfettet sind, ferner bei Geschwülsten, namentlich Carcinomen, aber auch bei weichen Sarkomen, und schliesslich bei zelligen Infiltraten, z. B. der Lunge.

Von **Flüssigkeiten**, die untersucht werden sollen, kann man in vielen Fällen sofort einen Tropfen auf den Objectträger bringen. Enthält die Flüssigkeit sehr viele Zellen und andere feste Bestandtheile, wie es bei Cysten, bei Darminhalt etc. der Fall ist, so empfiehlt es sich oft, den zu untersuchenden Tropfen, den man mit einer feinen Pipette oder auch mit einer Platinöse entnimmt, mit Wasser oder Kochsalzlösung entsprechend zu verdünnen. Umgekehrt muss man sehr zellarme Flüssigkeiten oft eine Zeitlang sedimentiren lassen, ehe man die Untersuchung mit Erfolg vornehmen kann. Eine sehr gute Methode, um in zellarmen Flüssigkeiten das zur Untersuchung nöthige Material zu sammeln, ist auch das neuerdings namentlich von Litten empfohlene Centrifugirungsverfahren.

Für die Untersuchung aller Flüssigkeiten ist zu bemerken, dass man dieselbe auch mit der Deckglastrockenmethode (cf. p. 9) in gefärbtem Zustande vornehmen kann.

In allen Fällen kann man sich die Untersuchung frischer Präparate durch Zusatz mancher Reagentien sehr erleichtern, die entweder die Fähigkeit haben, das Präparat durchsichtiger zu machen, oder gewisse Theile deutlicher hervortreten zu lassen, während sie andere nicht beeinflussen oder sogar zum Verschwinden bringen. Unter diesen Reagentien, die täglich in Gebrauch genommen werden, sind zu nennen:

1) Das **Glyzerin.** Es hat ausser seiner aufhellenden Eigenschaft den Vortheil, dass es nicht verdunstet und sich chemisch nicht verändert; es können daher die in ihm vertheilte Präparate, wenn man sie gegen den Luftzutritt abschliesst, conservirt werden. Man verwendet das Glyzerin meist in unverdünnter Form, seltener mit Wasser vermischt. Frische Präparate werden, wenn es sich nicht etwa um die Untersuchung von Pigment handelt, so stark aufgehellt, dass die Untersuchung in Glyzerin nicht statthaft ist. Dagegen kommt das Glyzerin sehr oft in Anwendung bei der Untersuchung ungefärbter Schnitte, die schon gehärtetem Material entstammen.

2) **Kali aceticum,** in gesättigter wässeriger Lösung (50%), besitzt ebenfalls eine aufhellende Wirkung, die aber geringer ist als die des Glyzerins, so dass auch frische Schnitte darin untersucht werden können. Die Präparate können in der Lösung ähnlich wie im Glyzerin conservirt werden.

3) **Essigsäure.** Sie hat den doppelten Vortheil, dass sie die Kerne zum Schrumpfen bringt und dadurch ihre Umgrenzung deutlicher hervortreten lässt, und dass sie das Bindegewebe zur Quellung bringt und so durchsichtiger macht. Fetttröpfchen widerstehen der Einwirkung der Essigsäure, während diese andererseits die Eiweisskörnchen, die sich im Protoplasma der Zellen bei der trüben Schwellung bilden, löst. Es ist daher die Essigsäure ein ausgezeichnetes Reagens für die Differentialdiagnose zwischen fettiger Degeneration und körniger Trübung. Mikrokokken bleiben ebenfalls von der Essigsäure unbeeinflusst. Auch die elastischen Fasern werden durch die Essigsäure nicht verändert und treten daher bei ihrer Anwendung in dem durchsichtig gemachten Bindegewebe deutlicher hervor.

Man wendet die Essigsäure meist in einer 1—2-proc. starken Lösung an, die man sich durch Verdünnen von Eisessig mit Wasser herstellt. In der Regel bringt man von der Essigsäure vermittels eines Glasstabes einen Tropfen an die Seite des Deckglases des Präparats, welches man vorher schon angesehen hat. Die Essigsäure dringt dann langsam ein, und man kann ihre Wirkung unter dem Mikroskop verfolgen. Das Eindringen der Essigsäure wird beschleunigt, wenn man an den entgegengesetzten Rand des Deckglases ein Stückchen Fliesspapier bringt, welches die Flüssigkeit ansaugt.

Fuchsinessigsäure besitzt in noch erhöhtem Maasse die Fähigkeit, den Kern deutlicher hervortreten zu lassen, weil sie nicht nur seine Contouren besser zum Vorschein bringt, sondern ihn auch färbt. Man stellt die Fuchsinessigsäure her, indem man zu der 2-proc. Essigsäure so viel Fuchsin giebt, dass die Farbe eine gesättigt rothe wird.

Schliesslich wendet man die Essigsäure auch noch an, um den Kalk in verkalkten Geweben zu lösen.

4) **Schwache wässerige Jodlösung** ist ebenfalls ein sehr bequemes Mittel, um die Kerne und die Umrisse der Gewebe überhaupt deutlicher zur Anschauung zu bringen. Man stellt die schwache Jodlösung her, indem man die gewöhnliche Lugol'sche Lösung (Jod 1, Jodkali 1, Wasser 100) so weit mit Wasser verdünnt, dass sie eine weingelbe Farbe annimmt.

5) **Kali- und Natronlauge.** Die Wirkung und demnach die Anwendungsweise ist eine ganz verschiedene, je nach dem Concentrationsgrade.

Die 1—3-proc. schwache Kalilauge hat die Fähigkeit, die meisten Gewebe aufzulösen. Es widerstehen ihr von den gewöhnlich in Betracht kommenden Gewebsbestandtheilen nur: a) das elastische Gewebe, b) die Fette, c) Pigmente, d) Bakterien.

Man kann daher bei der Untersuchung der genannten Dinge, namentlich zu differentiell-diagnostischen Zwecken, passend Gebrauch von der schwachen Kali- oder Natronlauge machen. Auch die Amyloidsubstanz ist resistent gegen die schwache Lauge, es kommt aber diese Eigenschaft bei mikroskopischen Untersuchungen selten zur Geltung, weil es specifische Reactionen auf Amyloid giebt.

Die 33-proc. starke Kali- und Natronlauge zerstört die

zelligen Gewebsbestandtheile nicht, sie löst dagegen die Kittsubstanz, welche dieselben verbindet, und wird daher zur Isolirung von Geschwulstzellen, glatten Muskelfasern, Drüsenknäueln etc. verwandt. Diese Auflösung wird meist schon in wenigen Minuten bewirkt; es dürfen aber danach die Theile nicht mit destillirtem Wasser in Berührung kommen, weil sonst eine Verdünnung der Lauge bewirkt wird, und die Wirkungsweise der verdünnten Kalilauge eintritt. Es muss vielmehr die Untersuchung in der starken Kalilauge selbst vorgenommen werden.

6) **Osmiumsäure.** Dieselbe wird in 1-proc. wässeriger Lösung angewandt und kann in derselben Weise wie die Essigsäure dem vorher zerzupften und mit einem Deckglas bedeckten Präparat zugesetzt werden. Sie hat die Eigenschaft, Fetttröpfchen braun bis schwarz zu färben, und ist daher ein werthvolles Reagens zum Nachweis von Fett, namentlich auch bei der fettigen Degeneration.

7) **Salzsäure,** 3—5-proc. Dient zum Erkennen von Verkalkungen Kalkconcrementen, u. s. w. Sie löst den phosphorsauren Kalk einfach auf, und es werden dadurch die vorher dunklen Partieen hell. Die Lösung des kohlensauren Kalks vollzieht sich unter der Bildung von Luft-($CO_2$-)Blasen.

8) **Färbung frischer Präparate** wird, wenn man nicht die Deckglastrockenmethode anwendet, so bewirkt, dass man vom Rande her einen Tropfen wässerige Farblösung, am besten Methylgrün oder Löffler's Methylenblau (s. p. 59) oder auch Fuchsinessigsäure (s. p. 8) zufliessen lässt. Hämatoxylin eignet sich dazu nicht.

---

## Drittes Capitel.

## Härtung der Präparate.

Sollen Präparate einer genaueren Untersuchung, namentlich an feineren Schnitten, unterworfen werden, so müssen sie durch die Härtung erst schnittfähig gemacht werden. Dabei ist vor allem darauf zu achten, dass die zu härtenden Stücke möglichst frühzeitig nach dem Tode oder nach der Entnahme aus dem Lebenden in die Härtungsflüssigkeit gebracht werden, um den Eintritt der Fäulniss zu verhindern.

1) **Alkohol** ist die am häufigsten benutzte Härtungsflüssigkeit. Man wendet Concentrationen von 90%—100% (resp. 99%) an. Oft empfiehlt es sich, die Stücke zunächst in 90—96-proc. Spiritus und erst am folgenden Tage in absoluten Alkohol zu bringen, weil sie dann weniger schrumpfen. Viele Objecte erlangen überhaupt schon in dem gewöhnlichen 96-proc. Spiritus eine vollständig ausreichende Festigkeit. Man kann übrigens dem 96-proc. Spiritus leicht alles Wasser entziehen, wenn man demselben ausgeglühtes Cuprum sulphuricum zusetzt. Dasselbe wird in einem Metalltiegel so lange geglüht, bis es zu einem weissen Pulver geworden ist. Wenn es in dem Spiritus blau geworden ist, muss es durch neues ersetzt oder von neuem ausgeglüht werden. Derartigen selbstbereiteten absoluten Alkohol muss man aber vor dem Gebrauch durch ein Filter giessen, weil sonst Kupferpartikelchen mit dem Präparat in Berührung kommen könnten. Bei subtileren Untersuchungen empfiehlt es sich dagegen, absoluten

Alkohol anzuwenden, weil er vor dem künstlich entwässerten Spiritus den Vorzug chemischer Reinheit hat.

Die in Alkohol zu härtenden Stücke werden in Würfel- oder in Scheibenform ausgeschnitten und sollen nicht mehr als 2–3 cm im Durchmesser haben. Die Menge des Alkohols soll 10—15 mal grösser sein als das Volum der Stücke. Am 2. und 4., nöthigenfalls auch noch am 6. Tage muss der Alkohol gewechselt und durch frischen ersetzt werden. Sehr rathsam ist es, das Glas am ersten Tage zu verschiedenen Malen zu schütteln, weil sonst leicht einzelne Stücke am Boden festkleben, und der Alkohol dann an deren unterer Seite nicht mehr zur Einwirkung gelangen kann.

Die Alkoholhärtung kann für die meisten Gewebe zur Anwendung kommen und ist besonders dann am Platze, wenn die Untersuchung der betreffenden Theile schnell vorgenommen werden soll. Ferner ist sie für Präparate, die auf Bakterien untersucht werden sollen, ganz vorzugsweise und mehr als die anderen Härtungsflüssigkeiten zu empfehlen. Man wählt hier von vornherein absoluten Alkohol, um die postmortale Weiterentwickelung der Bakterien im Gewebe sicher auszuschliessen und die Färbbarkeit derselben so gut wie möglich zu erhalten. Für die Gewebe des Nervensystems eignet sich die Alkoholhärtung in der Regel nicht.

Will man ganze Organe und Geschwülste für Sammlungen aufheben, so wird aus denselben in fliessendem Wasser erst das in ihnen enthaltene Blut ausgezogen, bis das Wasser klar abfliesst. Dann kommt sie in 70—80-proc. Alkohol, der so oft gewechselt wird, bis keine Trübung mehr entsteht.

2) **Die Müller'sche Flüssigkeit.** Sie besteht aus

| | |
|---|---|
| Doppeltchromsaurem Kali | 2,5 % |
| Schwefelsaurem Natron | 1,0 % |
| Wasser . . . . . | 100,0 %. |

Die vollkommene Härtung in dieser Flüssigkeit erfordert bei gewöhnlicher Temperatur für kleinere Objecte mindestees 12 Wochen, für grössere Organe, z. B. ganze Gehirne, aber bis zu einem Jahre. Der Härtungsprocess kann durch zeitweiliges Einstellen der Präparate in den Brütofen ziemlich beschleunigt werden. Man muss dann aber die Müller'sche Flüssigkeit recht häufig wechseln.

Die Flüssigkeit soll das 10—20 fache der zu härtenden Objecte betragen. Sie wird am 2., 4., 6. und 12. Tage und später jedesmal dann erneuert, wenn sie getrübt ist, oder wenn sich Spaltpilze in ihr entwickeln.

Die Präparate können mehrere Jahre, bis zu 10, in Müller'scher Flüssigkeit aufbewahrt werden; doch ist es zweckmässig, der Flüssigkeit nach Ablauf des ersten Jahres die Hälfte Wasser zuzusetzen.

Zur Nachhärtung, falls eine solche nöthig ist, kommen die Präparate, nachdem man sie kurze Zeit bis einige Stunden in oft erneuertem Wasser ausgewässert hat, zunächst für einen Tag in 30-proc. und dann in 96-proc. Spiritus. Wenn sich in diesem letzteren stärkere Niederschläge bilden, so wird er gewechselt. In Spiritus können die Präparate noch mehrere Jahre aufgehoben werden, verlieren aber mit der Zeit an Färbbarkeit.

Die Vortheile der Müller'schen Flüssigkeit gegenüber dem Alkohol sind folgende:

a) Die Gewebe schrumpfen in der Müller'schen Flüssigkeit weniger, und es werden Zellen und Zwischensubstanz besser erhalten.

b) Die rothen Blutkörperchen werden im Gegensatz zum Alkohol in der Müller'schen Flüssigkeit in ihrer Form ausgezeichnet conservirt und erhalten eine gelbe Farbe.

c) Die in Müller'scher Flüssigkeit gehärteten Präparate färben sich im Allgemeinen besser als diejenigen, welche in Alkohol conservirt waren, namentlich in dem am häufigsten zur Anwendung kommenden Hämatoxylinalaun. Diese bessere Färbbarkeit tritt jedoch nur dann hervor, wenn die Präparate hinreichend lange Zeit in Müller'scher Flüssigkeit gelegen haben. Anderenfalls ist die Färbung sogar eine viel unvollkommenere wie bei Alkoholpräparaten.

d) Die viel geringere Kostspieligkeit der Müller'schen Flüssigkeit im Gegensatz zum Alkohol.

Alkohol und Müller'sche Flüssigkeit reichen für die gewöhnlichen Bedürfnisse als Härtungsflüssigkeiten vollkommen aus.

3) **Erlicki'sche Flüssigkeit.** Dieselbe besteht aus:

| | | |
|---|---|---|
| Doppeltchromsaurem Kali | = | 2,5 |
| Schwefelsaurem Kupfer . | = | 0,5 |
| Wasser . . . . . | = | 100,0. |

Die Flüssigkeit hat den Vortheil, dass darin Präparate schon in 8—10 Tagen, im Brütofen sogar schon in 4—5 Tagen härten. Sie hat aber den Nachtheil gegenüber der Müller'schen Flüssigkeit, dass sie die Schrumpfung der Gewebe nicht so gut verhindert, und dass sich in den Präparaten manchmal Niederschläge bilden.

4) **Sublimat** ist für einzelne Fälle, auf die noch näher eingegangen wird, ein vorzügliches Härtungsmittel. Neben der Härtung bewirkt das Sublimat auch eine Fixation der Kerntheilungsfiguren. Man wendet eine in der Wärme gesättigte (7,5-proc.) Lösung von Sublimat in 0,5-proc. Kochsalzlösung an. In dieser Lösung verbleiben die Stücke, die nicht zu dick sein dürfen, 1—2, selten bis zu 6 Stunden. Dann folgt ein gründliches, am besten 24-stündiges Auswaschen in Wasser, und schliesslich eine Nachhärtung, je 24 Stunden lang in 30-proc., 70-proc. und 90-proc. Alkohol.

Auf das gründliche Auswaschen der Präparate kommt bei der Sublimathärtung viel an, weil sich sonst leicht Quecksilberniederschläge im Präparat bilden, die bei der späteren Untersuchung namentlich zur Verwechslung mit Pigment Veranlassung geben können. Man kann sich übrigens durch Zusatz von einigen Tropfen Jodlösung leicht davon überzeugen, ob in der Auswaschflüssigkeit noch Sublimat gelöst vorhanden ist. Solange dies der Fall ist, bewirkt Jodzusatz einen gelbrothen Niederschlag von Quecksilberjodid. Auch hat man empfohlen, dem zur Nachhärtung verwandten 70-proc. Alkohol so viel Jodtinctur zuzusetzen, dass derselbe eine weinrothe Farbe erhält. Das Jod entfernt dann durch Bildung von Quecksilberjodid das überflüssige Sublimat, und der Alkohol entfärbt sich.

Die Sublimathärtung empfiehlt sich im Allgemeinen mehr für Objecte, die der Leiche, wie für solche, die dem Lebenden entnommen sind.

5) **Zenker'sche Flüssigkeit.**

Härten 24 Stunden lang in einer Mischung von:

Sublimat 5,0,
Kali bichromic. 2,5,

Natrium sulphuric. 1,0,
Aqu. destillat. 100,0,
Eisessig 5,0.

Gründliches Auswaschen in Wasser. Nachhärten in 30 %—60 % — 96 % Spiritus.

Man kann die nicht kostspielige Flüssigkeit vorräthig halten, nur ist es zweckmässig, den Eisessig erst kurz vor dem Gebrauch zuzusetzen. Sehr grosse Stücke verweilen 48 Stunden, kleine nur einige Stunden in der Lösung. Die Reste der etwaigen Sublimatniederschläge kann man, ebenso wie bei der einfachen Sublimathärtung (s. p. 11) in Jodalkohol entfernen.

Färben kann man mit allen gebräuchlichen Färbemethoden. Die Flüssigkeit dringt sehr leicht in die Organe ein, die anfangs in ihr schwimmen, sie conservirt die chromatischen Figuren viel besser wie Müller'sche Flüssigkeit und gestattet Bakterienfärbung sowie auch, wenn die Präparate länger, bis zu 14 Tagen in ihr verweilen, die Weigert'sche Markscheidenfärbung. Auch die Biondi'sche Färbung lässt sich anwenden.

6) **Formalin.**

a) Härtung 3—4 Stunden lang in Lösung von Formol (= concentrirter Formaldehyd) 10 Theile in 100 Theilen Wasser.

b) Gründliches Auswaschen in Wasser, bis 12 Stunden lang.

c) Nachhärtung in 30 %—60 %—%—96 % Spiritus.

Die von Blum empfohlene Formalinhärtung bietet grosse Vortheile, namentlich die Schnelligkeit des Verfahrens, und die sehr gute Erhaltung der rothen Blutkörperchen in ihrer natürlichen Farbe. Ausserdem färben sich diese letzteren mit Eosin ganz besonders gut. Auf dem Gefriermikrotom können die Schnitte aus der Formalinlösung direct geschnitten werden, so dass man schon 12 Stunden nach der Section gefärbte Organschnitte fertigstellen kann. Färbung mit allen gebräuchlichen Färbemitteln.

Auch die makroskopische Eigenfarbe der Organe wird zum Theil in Formalin sehr gut erhalten.

Die concentrirte Formollösung enthält 40 % Formaldehyd, die wässerige Lösung 1: 10 daher 4 %. In vielen Fällen genügt zur Härtung auch eine geringere Concentration.

Ueber die Conservirung von Bakterienculturen durch Formalin, s. p. 64.

7) **Pikrinsäure** kommt in gesättigter wässeriger Lösung zur Anwendung. Kleine, nicht mehr als 1 cm dicke Stücke verbleiben bis zu 24 Stunden in derselben und werden dann in 70—80-proc. Spiritus übertragen. Es ist bei der Anwendung der Pikrinsäure als Härtungsmittel immer im Auge zu behalten, dass dieselbe auch den Kalk im Knochengewebe und in Verkalkungen auszieht. Die Schnitte der in Pikrinsäure gehärteten Stücke müssen sehr sorgfältig ausgewaschen werden, weil sie sonst Reste der gelben Färbung behalten.

Zur schnelleren und vollständigeren Entfernung von Pikrinsäure empfiehlt Jelinek einen Zusatz von einigen Tropfen gesättigter wässeriger Lithion-carbonicum-Lösung zu dem 95-proc. Spiritus, in welchen das Stück aus der Pikrinsäure übertragen wird. Unter Gelbfärbung des Spiritus löst sich der Niederschlag, der durch den Lithionzusatz entstanden war, und die Flüssigkeit wird vollkommen klar. Man setzt nun so lange einige Tropfen der Lithionlösung zu, bis sich

der Niederschlag nicht mehr löst, und der häufiger zu wechselnde Alkohol keine Gelbfärbung mehr aufweist. Dann wird das weiss erscheinende Stück in gewöhnlichen Alkohol übertragen.

8) **Osmiumsäure** wird in 1-proc. wässeriger Lösung als Härtungsmittel angewandt. Da die Osmiumsäure sehr schlecht in die Gewebe eindringt, so dürfen die zu härtenden Stückchen nicht mehr als 5 mm dick sein. Sie verbleiben in der Lösung 24 Stunden und werden dann in 80-proc. Spiritus übertragen. Die Osmiumsäure färbt Fetttröpfchen schwarz und ist deshalb, wenn es sich um den Nachweis von solchen handelt, zu empfehlen. Ueber die Härtung fettig degenerirter Theile s. p. 48.

Die mit Osmiumsäure behandelten Schnitte werden am besten in Kali aceticum (s. p. 8) aufgehoben, weil sich Glyzerin nach und nach bräunt. Man kann aber das Dunkeln des Glyzerins verhindern, wenn man die Schnitte vor ihrem definitiven Einschluss in demselben einige Tage in mit Wasser verdünntem Glyzerin oder in Wasser liegen lässt.

9) **Das FLEMMING'sche Säuregemisch** ist in vielen Fällen zur Härtung sehr geeignet. Ueber seine Anwendung s. p. 43 und p. 48.

10) **Gummiglyzerin** ist für manche Untersuchungen, namentlich wenn es dabei nicht auf histologische Feinheiten ankommt, zu empfehlen, weil die Härtung sehr schnell und vollständig bewerkstelligt wird.

Die Gummiglyzerinlösung wird so hergestellt, dass man zu kochendem Glyzerin unter fortwährendem Umrühren langsam so viel pulverisirten arabischen Gummi zusetzt, als sich löst.

Stücke, die frisch aus der Leiche entnommen sind, werden zuerst in fliessendem Wasser von Blut befreit, Stücke, die schon in Spiritus gelegen haben, werden zuvor in Wasser von ihrem Spiritus befreit. Dann überträgt man sie für 24 Stunden in die syrupdicke Gummiglyzerinlösung, in der man sie durch Glasstäbe etc. unter dem Niveau erhält. Nach 24 Stunden bringt man die Stücke in 80—90-proc. Spiritus und schüttelt das Glas wiederholt und stark. Sie werden dann innerhalb weniger Stunden sehr hart und schnittfähig.

Die einzelnen Schnitte werden vor der Färbung in reichlichem, eventuell zu wechselndem Wasser ausgewaschen, in welchem der durch den Alkohol niedergeschlagene Gummi sich wieder löst.

11) **Kochmethode,** ist namentlich dann zu empfehlen, wenn innerhalb der Gewebe befindliche eiweisshaltige Flüssigkeit durch Gerinnenmachen derselben fixirt werden soll, wie das besonders bei Lungenödem, Nephritis und bei Cysteninhalt nothwendig werden kann. Man bringt kleine, 1,5 cm dicke Würfel für 1—2—2½ Minuten in kochendes Wasser und härtet in 96-proc. Spiritus nach.

Die Gerinnung und Fixirung eiweisshaltiger Flüssigkeit lässt sich meist auch durch Härtung in absolutem Alkohol schon hinreichend gut bewirken.

## Viertes Kapitel.

## Die Entkalkung.

Knochen oder solche Gewebe, die verkalkte oder verknöcherte Partien enthalten, müssen, bevor sie schnittfähig sind, von ihren Kalksalzen befreit werden. Dabei sind folgende Regeln zu beachten:

1) Die betreffenden Theile müssen gut gehärtet sein, ehe sie in die Entkalkungsflüssigkeit übertragen werden, weil in dieser die übrigen Gewebe sonst zu sehr verändert werden. Die Härtung geschieht in Alkohol oder noch besser in Müller'scher Flüssigkeit mit nachfolgender Alkoholhärtung.

2) Die Entkalkungsflüssigkeit muss sehr reichlich sein und muss oft gewechselt werden.

3) Nach vollendeter Entkalkung müssen die Stücke sehr sorgfältig, zwei bis mehrere Tage lang in Wasser ausgewaschen werden, damit keine Reste von Entkalkungsflüssigkeit im Gewebe zurückbleiben und dessen Structur noch nachträglich schädigen.

4) Nachdem die Stücke gründlich ausgewaschen sind, müssen sie von neuem gehärtet werden und sind nun erst schnittfähig.

Die Zeit, die bis zur vollständigen Entkalkung nöthig ist, ist nicht nur verschieden nach der Concentration der Entkalkungsflüssigkeit, sondern hängt besonders auch von der Dicke und Grösse des zu entkalkenden Objects ab. Ausserdem sind Knochen von Neugeborenen und noch mehr fötale Knochen viel leichter und schneller zu entkalken als solche von Erwachsenen.

Es ist Regel, nicht zu grosse Stücke zur Entkalkung zu wählen. Man überzeugt sich von der vollständigen Entfernung der Kalksalze durch Einstechen mit einer Präparirnadel oder durch probeweises Einschneiden mit einem Skalpell.

Die am häufigsten angewendeten Entkalkungsflüssigkeiten sind folgende:

### I. Die Chromsäure und ihre Salze.

Eine geringe entkalkende Wirkung besitzt schon die Müller'sche Flüssigkeit, jedoch nur bei kleinen Knochenstückchen oder bei embryonalen Knochen. Für andere Objecte ist die zur Entkalkung erforderliche Zeit daher fast immer eine zu lange. Eine Beschleunigung kann man nach Haug erzielen, wenn man bei dem jedesmaligen Wechsel der Flüssigkeit, alle 3—5—8 Tage, je 1 ccm Salpetersäure auf 200 bis 300 ccm Flüssigkeit zusetzt. Ein Vortheil der Müller'schen Flüssigkeit ist die gute Conservirung der Gewebe.

Auch die reine Chromsäure in 2-proc. Lösung wirkt langsam entkalkend; eine etwas schnellere Wirkung erzielt man, wenn man ein Gemisch verwendet von

| | |
|---|---|
| Chromsäure | 1,0 |
| Salzsäure | 1,0 |
| Wasser | 100,0. |

Die Resultate sind nach Haug besonders bei jungen Knochen sehr gute.

Für zarte und kleine Objecte ist auch die Flemming'sche Lösung sehr zu empfehlen.

Waldeyer empfiehlt folgende Chromsäuremethode:
1) Fixirung des frischen Objects in Chromsäure 1 : 600.
2) Härtung in Chromsäure 1 : 400, später 1 : 200.
3) Entkalkung in einer alle 6 Tage zu wechselnden Mischung von
Chromsäure (1 : 200) 100 ccm
Reine Salpetersäure 2 „
Gründliches Auswaschen. Nachhärtung in Alkohol.
Die Dauer der Entkalkung beträgt ein Vierteljahr und mehr.
Die Fol'sche Entkalkungsflüssigkeit hat folgende Zusammensetzung:

| | | |
|---|---|---|
| Chromsäure (1 Proc.) | = | 70 Theile |
| Salpetersäure | = | 3 „ |
| Wasser | = | 200 „ |

Für sehr zarte Objecte empfiehlt Haug folgende Entkalkungsflüssigkeit:

| | |
|---|---|
| 1-proc. Osmiumsäure | 10 ccm |
| 1-proc. Chromsäure | 25 „ |
| Aq. destillat. | 65 „ |

Auswaschen in Wasser. Nachhärten in 70-proc. Alkohol.

**II. Gesättigte wässerige Pikrinsäurelösung.**

Man wendet am besten eine wässerige Lösung an, welche Pikrinsäure im Ueberschuss enthält. Dieselbe wirkt zugleich härtend, fixirend und färbend.

Die Tibia eines Neugeborenen, unzerschnitten eingelegt, ist in etwa 3 Wochen entkalkt. Bei grösseren und älteren Knochen beträgt die Dauer bis zu mehreren Monaten. Eine Beschleunigung kann man erreichen, wenn man 3—5 proc. Salpetersäure zusetzt. Verbindungen mit Schwefelsäure sind dagegen nicht statthaft, weil sich dabei die fast unlöslichen schwefelsauren Kalksalze bilden.

**III. Milchsäure, in 10-proc. und stärkeren Lösungen.**

Dieselbe entkalkt ziemlich viel schneller, wie Pikrinsäure, und greift dabei die Gewebe nur wenig an.

**IV. Holzessig** (Acidum pyrolignosum purum).

Derselbe wird in unverdünntem Zustande von Haug namentlich empfohlen für fötales Knochengewebe, für solches von niederen Thieren, sowie für Knochen- und Knorpelknochengeschwülste. Er wirkt zugleich etwas erhärtend. Für erwachsene Knochen eignet er sich nicht besonders.

**V. Salzsäure.**

Sie kommt meist zur Anwendung als
v. Ebner's Entkalkungsflüssigkeit
Dieselbe hat folgende Zusammensetzung:

| | |
|---|---|
| Salzsänre | 2,5 |
| Alkohol | 500,0 |
| Destillirtes W. | 100,0 |
| Chlornatrium | 2,5 |

Die Ebner'sche Flüssigkeit, wirkt langsamer, aber auch viel schonender, wie die früher rein in 1—10-proc. Lösung angewandte Salzsäure. Man kann die Entkalkung dadurch beschleunigen, dass man den Säurezusatz bis auf 5 Proz., zugleich aber auch in entsprechendem Verhältniss den Chlornatriumgehalt steigert.

In die Ebner'sche Entkalkungsflüssigkeit kann man auch in Cello-

idin eingebettete Stücke, bei denen die Entkalkung nicht vollkommen gelungen ist, zurückverbringen. Man erreicht dadurch eine bessere Entkalkung wenigstens der oberen Schichten. Vor dem Schneiden muss man die Säure in 75-proc. Spiritus entfernen.

Waldeyer empfiehlt folgende Chlorpalladiumlösung:

| | |
|---|---|
| Palladiumchlorid | 0,01 |
| 1-proc. Salzsäurelösung | 1000,0. |

Nach gründlichem Auswaschen wird successive in 30-proc., 60-proc. und 90-proc. Spiritus nachgehärtet.

**VI. Reine Salpetersäure.**

Sie wird in der Verdünnung von 3—5—9 Theilen auf 100 Theile Wasser angewandt. Sie ist namentlich für Knochen Erwachsener geeignet.

Die einfach wässerigen Lösungen von Salpetersäure verändern die Structurverhältnisse noch weniger, wie die entsprechenden Salzsäurelösungen. Um die durch das lange Verweilen in wässeriger Lösung bedingte Aufquellung zu vermeiden, empfiehlt Haug folgende alkoholische Lösung:

| | |
|---|---|
| Acidum nitricum purum | 30,0—90,0 |
| Alcohol absolut. | 700,0 |
| Aqu. destillat. | 300,0 |
| Chlornatrium | 2,5. |

Diese Lösung entkalkt schnell und doch schonend. Sie eignet sich sowohl für fötalen, wie für jugendlichen und erwachsenen Knochen. Besonders empfehlenswerth ist vorherige Fixirung der Objecte in Sublimat, doch bleibt auch nach allen anderen Härtungsmethoden die Färbbarkeit sehr gut erhalten. Eine besondere Modification der Salpetersäureentkalkung stellt dar die

Phloroglucinmethode.

Das Phloroglucin wirkt nicht selbst entkalkend, sondern es schützt nur die Gewebe in ausgezeichneter Weise vor der gleichzeitig anzuwendenden Säure, sodass die Methode eine sehr empfehlenswerthe ist. Dabei kann die Säure in so starken Concentrationen einwirken, dass die Entkalkung bei kleinen Knochenstücken schon nach einer halben, bei härterem Knochenmaterial nach einigen Stunden vollendet ist. Es ist deshalb nöthig, bei Anwendung dieser Methode das Präparat fortwährend zu controlliren.

Die Lösung wird in folgender Weise hergestellt:

Phloroglucin 1,0 wird in reiner, nicht rauchender Salpetersäure 10,0 unter vorsichtigem Erwärmen gelöst, am besten unter dem Abzug des chemischen Herdes, da bei der Mischung unter stürmischer Entwicklung braunrother Dämpfe von salpetriger Säure eine bedeutende Wärmeentwicklung eintritt. Nach Scheffer ist die Erwärmung der Salpetersäure überhaupt entbehrlich.

Zu dieser (rubinrothen) Stammlösung werden hinzugesetzt 10-proc. wässerige Salpetersäurelösung 100 ccm.

Will man grössere Mengen von Entkalkungsflüssigkeit verwenden, so muss man auch grössere Mengen von Stammflüssigkeit frisch bereiten.

Eine etwas langsamer wirkende Entkalkungsflüssigkeit ist die folgende:

| | |
|---|---|
| Phloroglucin | 1,0 |
| Acid. nitric. | 5,0 |

Alkohol 70,0
Aqu. destillat. 30,0.

Die Entkalkungsmethode von Thoma bedient sich ebenfalls der Salpetersäure in folgender Weise:

1) Härtung in Müller'scher Flüssigkeit oder in Alkohol.
2) Entkalkung in einer öfter zu wechselnden Lösung von
   96-proc. Spiritus 5 Raumtheile,
   officinelle, reine, concentrirte Salpetersäure 1 Raumtheil.
3) Abspülen in Spiritus.
4) Uebertragen in häufiger zu wechselnden Spiritus, dem präcipitirter kohlensaurer Kalk im Ueberschuss zugesetzt ist.

Die Entkalkung ist in 2—3 Wochen auch bei grösseren Stücken vollendet. Um das Anhaften von Kalkpulver zu vermeiden, umhüllt man die Stücke passender Weise mit Fliesspapier. Die Entsäuerung in kalkhaltigem Spiritus dauert im Ganzen 8—14 Tage. Sie ist auch noch einige Tage lang fortzusetzen, nachdem durch Lakmuspapier schon keine Säure mehr angezeigt wird.

---

## Fünftes Capitel.

## Einbettungsmethoden.

Die Einbettungsmethoden haben einmal den Zweck, Präparate, die auch bei sorgfältiger Härtung nur eine mässige Festigkeit erlangen, schnittfähig zu machen; daneben sind aber manche Einbettungsmassen, die bei der Färbung und Untersuchung nicht aus den Schnitten entfernt zu werden brauchen, befähigt, einzelne Gewebsbestandtheile oder abnormen Inhalt zu fixiren, so dass bei den verschiedenen Manipulationen, denen der Schnitt ausgesetzt wird, Nichts ausfällt.

### Celloidineinbettung.

Das Celloidin erfüllt diese beiden Voraussetzungen so gut wie keine andere Einbettungsmasse, weil dasselbe in den Schnitten vollständig durchsichtig bleibt, die meisten Farben beim Auswaschen wieder abgiebt und demgemäss aus den Schnitten nicht entfernt zu werden braucht. Man stellt sich eine dünnflüssige und eine dickflüssige Celloidinlösung her, letztere von der Consistenz dicken Syrups, indem man das in ganz kleine Stückchen zerschnittene Celloidin in Alkohol und Aether zu gleichen Theilen löst.

Die Präparate müssen vorher in absolutem Alkohol vollkommen entwässert sein; dagegen ist es nicht nöthig, sie nach der Entwässerung im Alkohol noch in ein Gemisch von Alkohol und Aether zu verbringen, wie das vielfach empfohlen wird. Aus dem Alkohol kommen dann die Stückchen, die nicht dicker als 1 cm sein sollen, zunächst für mindestens 24 Stunden in die dünne und dann ebenso lange in die dicke Celloidinlösung. Wenn es sich um schwieriger zu behandelnde Objecte handelt, sowie in allen Fällen, in denen die Zeit nicht drängt, empfiehlt es sich, den Aufenthalt der Stücke in beiden Celloidinlösungen auf mehrere Tage zu verlängern, da die Einbettung um so besser gelingt, je länger und je mehr die Präparate von den beiden Celloidinlösungen durchtränkt worden sind.

Aus der dickflüssigen Celloidinlösung bringt man die Stücke auf

eine kleine Glasplatte, wenn sie später auf dem Gefriermikrotom geschnitten werden sollen, dagegen direct auf Kork, wenn eines der gewöhnlichen Schlittenmikrotome in Anwendung kommen soll, bei denen das Präparat auf einem Kork in einer Klammer zu befestigen ist. Auf der Glasplatte oder dem Kork kann man das Object noch mit etwas dicker Celloidinlösung übergiessen, wenn nicht von derselben schon von selbst genug haften bleibt. Man lässt nun das Präparat mit dem umgebenden Celloidin an der Luft etwas eintrocknen und bringt dasselbe dann für 24 Stunden in 80-proc. Alkohol, in dem die Einbettungsmasse vollständig fest wird. Der Consistenzgrad, den die Präparate hier erlangen, ist sehr wesentlich abhängig davon, ob man das Celloidin schnell oder langsam an der Luft eintrocknen lässt. Die langsam getrockneten Präparate werden viel fester. Will man daher gefroren schneiden, so genügt schon ein $^1/_2$-stündiges Verweilen des Stückes an der Luft, bevor es in 80-proc. Spiritus kommt, um eine genügende Festigkeit zu erlangen. Die Stückchen werden sonst leicht beim Gefrieren zu fest und heben sich von der Platte des Gefriermikrotoms ab.

Schneidet man aber auf einem der anderen Mikrotome, so ist es dringend zu empfehlen, das Eintrocknen des Präparates durch Abschluss der Luft unter einer Glasglocke möglichst zu verlangsamen. Am besten gelingt dies, wenn man das Präparat nicht einfach mit dem anhaftenden Celloidin auf dem Kork unter die Glasglocke bringt, sondern wenn man den Kork mit einem Streifen Cartonpapier ringförmig umwickelt und den Streifen durch eine Stecknadel befestigt. In das Kästchen, welches auf diese Weise entsteht, giesst man zunächst eine dünne Schicht Celloidin, dann setzt man das Präparat ein und giesst nun so viel Celloidinlösung auf, dass dieselbe das Stück reichlich bedeckt. Auf diese Weise ist es ermöglicht, weil das Präparat von einer verhältnissmässig sehr reichlichen Menge von Celloidinlösung umgeben ist, das Eintrocknen ganz langsam innerhalb von 1—2—3 Tagen eintreten zu lassen, und es sind die so erhaltenen Präparate gerade so fest wie solche, die in Paraffin eingebettet sind. Präparate, die nicht von selbst in der gegebenen Lage verharren, z. B. membranartige Theile, fixirt man vermittels Stecknadeln, die man ganz lose in den Kork einsticht. Der Papierring wird erst entfernt, wenn das Object in Alkohol vollständig fest geworden ist. Man giebt dann durch Umschneiden dem Celloidinblock die Form eines Vierecks, weil er sich so auf dem Mikrotom am besten schneiden lässt.

Celloidinpräparate, die auf Kork aufgeklebt sind, verlieren bei längerem Verweilen im Spiritus durch die Einwirkung der im Kork enthaltenen Gerbsäure an Färbbarkeit. Es gilt dies ganz besonders von Präparaten, die Schleim enthalten, z. B. Ovarialcysten. Um diesem Nachtheil zu begegnen, empfiehlt Jelinek zum Aufkleben Stabilit, welcher in Wasser und Alkohol unlöslich, und selbst von Salzsäure, verdünnter Schwefelsäure und Aetzkali nicht angegriffen wird. Stabilit ist in Plattenform von der Berliner Electricitätgesellschaft zu beziehen, und lässt sich mit der Säge leicht zertheilen, und durch Behandeln mit Schmirgelpapier und nachfolgendes Abreiben mit einem trockenen Tuch glatt poliren. In Wasser geht Stabilit unter.

Soll der Celloidinmantel um die einzelnen Schnitte erhalten bleiben so dürfen dieselben zum Zwecke der Entwässerung nicht zu lange in absolutem Alkohol verweilen, in dem sich das Celloidin nach einiger Zeit löst. Man bringt dann zur Entwässerung nach der Färbung und

dem Auswaschen den Schnitt zuerst in 96-proc. Spiritus, wo ihm schon ein grosser Theil des Wassers entzogen wird. Zum Entfernen des letzten Restes von Wasser ist dann nur ein so kurzer Aufenthalt in absolutem Alkohol nöthig, dass das Celloidin nicht gelöst wird. Nikiforoff empfiehlt zur Erhaltung des Celloidinmantels die Entwässerung in absolutem Alkohol und Chloroform zu gleichen Theilen, d. h. den Zusatz einer wasserfreien, Celloidin nicht lösenden Flüssigkeit, welche sich mit Alkohol gut mischt.

Nelkenöl, welches das Celloidin augenblicklich auflöst, muss zur Aufhellung vermieden werden. Man wendet Bergamott-, Cedern- oder Hopfenöl an. In anderen Fällen, namentlich bei Anilinfärbungen, ist es oft geboten, vor der Färbung das Celloidin aus dem Präparate vollkommen zu entfernen. Man bringt dann die Schnitte aus dem Wasser oder verdünnten Spiritus, in welchem sie von dem Messer des Mikrotoms aufgenommen wurden, in absoluten Alkohol, von diesem für 10—15 Minuten in ein Gemisch von absolutem Alkohol und Äther zu gleichen Theilen oder in Nelkenöl, dann wieder zurück in absoluten Alkohol, schliesslich in Wasser und nun erst in die Farbe.

Dem Gesagten zufolge zerfällt die Celloidineinbettung und die Weiterbehandlung der eingebetteten Stücke in folgende Manipulationen:

1) Härtung oder Nachhärtung in absolutem Alkohol.
2) 1—5-tägiges Verweilen in dünnflüssigem Celloidin.
3) 1—5-tägiges Verweilen in dickflüssigem Celloidin.
4) Auf Kork oder Glasplatte, an der Luft Trocknen.
5) 24 Stunden lang in 80-proc. Spiritus.
6) Schneiden.
7) Färben und Auswaschen.
8) Entwässern in 96-proc., dann noch 1—2 Minuten in absolutem Alkohol oder in Alkohol und Chloroform zu gleichen Theilen.
9) Aufhellen in Bergamott-, Cedern- oder Origanumöl oder in Xylol.
10) Kanadabalsam.

## Einbettung in Paraffin.

Die Einbettung in Paraffin hat gegenüber der Celloidineinbettung gerade für pathologisch-anatomische Präparate manche Nachtheile, so dass sie nicht so häufig zur Anwendung kommt.

Einmal ist die längere Erwärmung der Präparate auf 50° C eine eingreifende Procedur; dazu kommt aber, dass das Paraffin vor dem Einlegen der Schnitte entfernt werden muss, und dass damit ein Hauptvortheil der Einbettung: Fixiren von lockeren Gewebsbestandtheilen, Exsudaten, Auflagerungen etc. in ihrer Lage, verloren geht. Andererseits ist die bei der Paraffinbehandlung sehr bequeme Vorfärbung des ganzen Stückes für pathologisch-anatomische Zwecke nicht so häufig anwendbar.

Das Verfahren ist folgendes:

Die Präparate müssen in absolutem Alkohol gehärtet oder nachgehärtet sein. Aus diesem kommen sie für 24 Stunden in ein Lösungsmittel des Paraffins, als welches sich neben den ätherischen Oelen namentlich das Xylol bewährt hat. Nun werden sie in ein bei 50° C flüssiges Paraffingemisch (die einzelnen Paraffine haben verschiedene Schmelzpunkte) im Thermostaten bei 50° C gebracht. Nachdem sie sich hier mit dem flüssigen Paraffin durchtränkt haben, wird dasselbe in

ein aus Cartonpapier oder durch Aneinanderschieben von zwei rechteckigen Metallrahmen auf einer Glasplatte hergestelltes Kästchen ausgegossen, und das Präparat darin in der gewünschten Lage fixirt. Die Lage des Präparats muss man sich genau merken, da man sich an dem nach dem Erstarren undurchsichtigen Paraffinblock nicht mehr orientiren kann. Das Erstarren des Paraffins wird durch Umgiessen mit kaltem Wasser beschleunigt. Der so entstehende Paraffinblock wird zurechtgeschnitten, in die Klammer des Mikrotoms eingeklemmt und — ohne das Messer zu befeuchten — geschnitten.

Die Schnitte kommen zur Entfernung des Paraffins in Xylol, von da in Alkohol, dann in Wasser und schliesslich, wenn die Stücke nicht in toto vorgefärbt waren, in die Farbflüssigkeit.

Demnach zerfällt das Verfahren der Paraffineinbettung in folgende Maassnahmen:

1) Härtung oder Nachhärtung in absolutem Alkohol.
2) 24 Stunden in Xylol.
3) 1—12 Stunden bei 50° im Wärmekasten in flüssiges Paraffin.
4) Ausgiessen und Erstarren.
5) Schneiden.
6) Xylol.
7) Alkohol.
8) Wasser, Färben etc.

In der Regel sind die Paraffinschnitte zu brüchig, als dass man mit ihnen ohne weiteres die verschiedenen Manipulationen vornehmen könnte, die zum Färben und Einlegen nöthig sind. Man klebt vielmehr die einzelnen Schnitte auf dem Objectträger fest. Zu dem Zwecke bestreicht man diesen mit einer ganz dünnen Schicht von Nelkenöl und Collodium 3 : 1. Nachdem die Schnitte angedrückt und aufgeklebt sind, bringt man den Objectträger für 5—10 Minuten auf ein Wasserbad oder in den auf 60° C. erwärmten Brütofen. Von da kommt der Objectträger zur vollständigen Entfernung des Paraffins in ein Gefäss mit Xylol. Dann werden die Präparate, falls sie schon im Stück vorgefärbt waren, in Kanadabalsam eingeschlossen. Sind die Präparate aber noch nicht gefärbt, so wird der Objectträger aus dem Xylol zuerst in 96-proc. Spiritus übertragen, dann kommt er der Reihe nach in Wasser, Farbe, Auswaschflüssigkeit, Alkohol, Xylol. Dann Einschluss des Präparates in Kanadabalsam. Ausser dem Nelkenöl-Collodium giebt es noch eine Reihe von anderen Aufklebemassen, von denen die folgenden erwähnt seien:

Eiweisslösung. Man stellt sich dieselbe so her, dass man ein abgemessenes Quantum von Eiweiss zu Schaum schlägt und dann mit dem gleichen Volum reinen Glyzerins versetzt. Die Masse wird filtrirt und in ganz dünner Schicht auf den Objectträger aufgetragen. Nachdem die Paraffinschnitte aufgelegt sind, bringt man den Objectträger für kurze Zeit aufs Wasserbad oder in den Brütschrank bei 60°, wo die Lösung erstarrt und die Schnitte fest ankleben.

Schellacklösung. Man stellt sich eine concentrirte Lösung von weissem Schellack in absolutem Alkohol her und breitet diese Lösung mit einem Glasstab ganz dünn auf dem erwärmten Objectträger aus. Man drückt nun die einzelnen Schnitte auf der Schellackdecke an und setzt dann in einem Gefäss den Objectträger den Dämpfen einer auf dem Boden befindlichen kleinen Menge von Aether aus.

Nachher: Wasserbad oder Wärmeschrank — Xylol zur Entfernung des Paraffins etc., wie oben.

### Combinirte Celloidinparaffinmethode.

Durch Combination der Celloidin- und der Paraffineinbettung erhält man oft eine sehr gute Schnittfähigkeit der Präparate, so dass sich grosse und dabei doch hinreichend dünne Schnitte erzielen lassen.

Das Verfahren ist folgendes:

1) Uebertragen des Objects aus dem Alkohol in eine Mischung von absolutem Alkohol und Aether zu gleichen Theilen, für einige Stunden

2) Durchtränkung in mässig dicker Celloidinlösung 24 Stunden lang.

3) Uebertragen in Ol. Origani.

4) Uebertragen in eine Mischung von Paraffin und Ol. Origani, welche bis auf höchstens 40° erwärmt ist.

5) Uebertragen in geschmolzenes Paraffin.

Die weitere Behandlung wie bei der gewöhnlichen Paraffineinbettung.

### Andere Einbettungsmethoden.

Die Einbettung in Seifen verschiedener Composition und in Mischungen von Eiweiss dürfte seit der Einführung des Celloidins in die mikroskopische Technik für pathologisch-anatomische Untersuchungen kaum noch zur Anwendung kommen.

Erwähnung verdienen aber noch einige Methoden, die für gröbere und schnell anzustellende Untersuchungen manchmal Verwendung finden.

Um kleine Objecte, namentlich auch membranartige Theile schnell schnittfähig zu machen, kann man dieselben zwischen zwei Stücke gehärteter Rinds- oder Amyloidleber einklemmen. Man verfährt so, dass man ein Stück Amyloidleber halbirt, das zu schneidende Object zwischen die beiden Hälften bringt und nun aus freier Hand mit dem Rasirmesser oder auch mit einem kleinen Cylindermikrotom Schnitte durch die Leber macht, die dann immer zugleich einen Schnitt des zu untersuchenden Stückes liefern.

Zu demselben Zwecke kann man auch Holländer Käse verwenden, der einige Zeit bei 25° C in 95-proc. Spiritus gestanden hat.

Hollundermark wendet man in ähnlicher Weise an: Man spaltet dasselbe und bringt das zu schneidende Object zwischen die beiden Hälften. Das Hollundermarkstückchen mit dem Präparat wirft man dann für einige Minuten in Wasser, wo das Hollundermark aufquillt und das Präparat nun fest umschliesst. Man schneidet ebenfalls frei oder in einem Cylindermikrotom.

Eine weitere primitive Einbettungsmethode besteht darin, dass man das zu schneidende Object, welches nur wenige Millimeter hoch sein darf, auf einem Kork in einen grossen Tropfen Gummilösung hereinstellt. Dann bringt man den Kork in 95-proc. Alkohol, wo der Gummi erstarrt und einen festen Mantel um das Präparat bildet.

## Sechstes Capitel.

## Injectionsverfahren.

Zur besseren Sichtbarmachung von Blutgefässen, namentlich des unter gewöhnlichen Verhältnissen wenig hervortretenden Capillarsystems, dann auch von Lymphgefässen, von Drüsenkanälen mit ihren Verzweigungen etc. bedient man sich der Injectionsmethode, d. h. der künstlichen Füllung der betreffenden Hohlräume mit einer Farbstofflösung; es kommt aber das Injectionsverfahren für die pathologische Histologie nicht so häufig zur Anwendung, wie für die normale.

Hauptbedingung ist, dass die Farbflüssigkeit nicht unter zu hohem Druck eingetrieben wird, weil sonst leicht die Gefässwände reissen und so künstliche Extravasate entstehen; ausserdem muss der Druck ein möglichst constanter sein. Bei hinreichender Uebung kann man auch bei Anwendung der gewöhnlichen Spritzen erheblichere Druckschwankungen vermeiden. Das Verfahren ist aber ein etwas langwieriges. Die Spritze muss sorgfältig gearbeitet sein und der Stempel sich leicht hin und her bewegen lassen. Zwischen dem Ansatzstück der Spritze und der in das Gefäss einzuführenden Canüle muss eine Abschlussvorrichtung vorhanden sein, damit man beim Ab- und Ansetzen der Spritze behufs neuer Füllung nicht in Gefahr kommt, Luftblasen mit zu injiciren. Ausserdem ist es gut, wenn man Canülen von verschiedenem Durchmesser besitzt. Dieselben werden in den Anfangstheil des Gefässes eingebunden, und die Injection so lange fortgesetzt, bis eine hinreichend intensive Färbung erreicht ist, oder bis die Injectionsflüssigkeit aus der Vene eine Zeit lang abgeflossen ist.

Sehr häufig ereignet es sich, dass schon im Anfang der Injection die Flüssigkeit aus oberflächlich verletzten Gefässen, namentlich auch aus den Kapselvenen (Niere) abfliesst. Derartige Gefässe schliesst man, wenn die austretende Flüssigkeit reichlicher ist, durch Schieberpincetten oder durch Serres fines.

Einen Apparat zum Injiciren unter constantem, nach Belieben zu steigerndem oder zu verminderndem Druck kann man sich, wenn man eine Wasserleitung zur Verfügung hat, mittels zweier Flaschen leicht herstellen. Die erste dieser Flaschen, A, die luftdicht verschlossen ist, steht vermittels eines bis auf den Boden reichenden Glasrohres und eines sich daran ansetzenden Schlauches mit dem Hahne einer Wasserleitung in Verbindung. Ausserdem führt von dieser Flasche ein zweites, winklig gebogenes Glasrohr in die mit einem doppelt durchbohrtem Stöpsel versehene zweite Flasche B, in die es ziemlich dicht unter dem Stöpsel einmündet. Diese Flasche B ist dann ganz ähnlich wie die gewöhnlichen Spritzflaschen mit einem zweiten ebenfalls gebogenen, bis auf den Boden reichenden Glasrohr versehen, an dessen Ausmündungsstelle ein Gummischlauch mit der betreffenden Canüle angebracht ist.

Füllt man nun die zweite Flasche B mit der Injectionsflüssigkeit und lässt in die Flasche A ein gewisses Quantum Wasser von der Leitung laufen, so drückt die dadurch in A comprimirte Luft in der Flasche B auf die Injectionsflüssigkeit und bringt diese zum Ausfliessen.

Kann man die Wasserleitung nicht benutzen, so muss dieselbe durch eine dritte Flasche C ersetzt werden, welche höher steht und welche

mit Wasser oder mit Quecksilber gefüllt ist. Diese dritte Flasche C ist dann mit der Flasche A durch einen mittels Quetschhahn verschliessbaren Gummischlauch verbunden. Oeffnet man diesen Quetschhahn, so fliesst ein beliebig zu normirendes Quantum Wasser, resp. Quecksilber in die Flasche A und wirkt dann, indem in dieser die Luft comprimirt wird, in derselben Weise wie die Wasserleitung.

Es ist selbstverständlich, dass die Flasche C, wenn sie mit Wasser gefüllt ist, viel höher stehen muss, als wenn sie Quecksilber enthält.

Es sind nun sog. kaltflüssige Injectionsmassen im Gebrauch, bei denen der Farbstoff in Wasser oder Glyzerin suspendirt ist, und warmflüssige Injectionsmassen, die einen Zusatz von Leim enthalten und daher nur in der Wärme flüssig sind, während sie bei gewöhnlicher Temperatur erstarren.

Die letzteren geben bessere Resultate, das Verfahren ist aber umständlicher, weil sowohl die Injectionsmasse, wie das zu injicirende Organ auf 40—50° gehalten werden müssen. Das letztere bringt man am besten in Wasser von der eben genannten Temperatur.

Von den zahlreichen Injectionsmassen, die empfohlen worden sind, seien hier nur die folgenden angeführt:

1) Lösliches Berliner Blau 1,0
   Aqua destillata 20,0.

2) Injectionsflüssigkeit von Cohnheim.
   Anilinblau 1,0
   0,5-proc. Kochsalzlösung 600,0.

3) Leimmasse und Berliner Blau nach Thiersch; man bereitet sich:
   A) eine kaltgesättigte Lösung von schwefelsaurem Eisenoxydul;
   B) eine kaltgesättigte Lösung von rothem Blutlaugensalz;
   C) eine gesättigte Lösung von Oxalsäure;
   D) eine Lösung von Leim im Verhältniss 2 : 1.

Es werden nun zunächst 15 g von D mit 6 ccm von A in einer ersten Porzellanschale vermischt. Dann werden in einer zweiten Schale 30 g von D mit 15 ccm von B vermischt, und dann noch 12 ccm von C hinzugefügt.

Nun wird, nachdem die Massen in beiden Schalen auf 30° abgekühlt sind, der Inhalt der ersten Schale tropfenweise und unter beständigem Umrühren zu dem in der zweiten Schale gegeben. Dann wird die ganze intensiv blau gefärbte Masse auf 70—100° erhitzt und in einem Heisswassertrichter durch Flanell filtrirt.

4) Kollmann's kaltflüssige Karmininjection.

1 g Karmin wird in wenig Wasser mit 15 Tropfen concentrirtem Ammoniak gelöst und mit 20 ccm Glyzerin verdünnt.

Dazu setzt man eine Mischung von Glyzerin 30 und Kochsalz 1 g. Das Ganze wird dann mit der gleichen Menge Wasser verdünnt.

Zu bemerken ist noch, dass man fertige gute kalt- und warmflüssige Injectionsmassen von Dr. Grübler, Leipzig, Bayersche Strasse 12, beziehen kann.

Hat man eine Leiminjectionsmasse angewandt, so bringt man das Organ nach vollendeter Injection in kaltes Wasser, um das Erstarren der Injectionsmasse zu beschleunigen, von da wird es in 80-proc. Spiritus übertragen.

Organe, die mit kaltflüssiger Injectionsmasse injicirt sind, werden

direct in Spiritus gebracht und hier nach einigen Stunden in nicht zu kleine Stücke zerschnitten.

Erwähnung verdient noch die Injection der Lymphgefässe durch die Einstichmethode. Eine feine Canüle wird vorsichtig an der betreffenden Stelle eingestochen, und zwar oft am zweckmässigsten durch eine Gefässwand hindurch, in deren Umgebung hinein. Dann werden unter sehr vorsichtigem Druck die so getroffenen Lymphspalten und Lymphgefässe injicirt.

---

## Siebentes Capitel.

## Anfertigung und Aufbewahrung von Schnitten. Serienschnitte.

Zur mikroskopischen Untersuchung geeignete Schnitte lassen sich sowohl von frischen, wie von gehärteten Präparaten gewinnen; gewöhnlich werden sie aber von den letzteren hergestellt, weil sie viel dünner und gleichmässiger werden, weil sie sich besser färben und auch besser als Dauerpräparate aufgehoben werden können. Man darf es jedoch nicht unterlassen, auch Schnitte von frischen Präparaten in Wasser oder in 0,6-proc. Kochsalzlösung, eventuell auch nach den übrigen, p. 5 angegebenen Methoden, zu untersuchen, da manche Eigenschaften der Gewebe sich bei der Härtung ändern.

Für manche Untersuchungen genügen mit freier Hand geführte Schnitte, welche mit einem scharfen, auf beiden Seiten hohl geschliffenen Rasirmesser ausgeführt werden. Die Schneide des Messers muss vollkommen gerade, darf also nicht gebaucht sein.

Das zu schneidende Object wird mit dem Daumen und dem Zeigefinger der linken Hand gefasst, so dass es über die Radialseite des Zeigefingers etwas hervorragt. Es wird zunächst eine glatte Schnittfläche angelegt und von dieser dann möglichst dünne Schnitte abgeschnitten.

Die Klinge des Messers wird da, wo sie am Griff befestigt ist, mit dem Daumen und dem Zeigefinger der rechten Hand gefasst. Sie wird dann unter leichter Neigung der Schneide gegen das Präparat gezogen, ohne Anwendung irgend eines, auch nur geringen Drucks. Das Schneiden geschieht also durch Zug, nicht durch Druck!

Man gewinnt gleichmässigere Schnitte und erleichtert sich das Schneiden, wenn man die Messerklinge auf die Radialseite des linken Zeigefingers, welcher das Präparat hält, auflegt und so eine Stütze für dieselbe gewinnt.

Stets muss das Messer ausgiebig befeuchtet sein, und zwar bei frischen Präparaten mit Wasser oder schwachem, bei gehärteten mit starkem Spiritus. Von der Messerklinge bringt man die Schnitte in eine flache, breite Schale mit Wasser oder dünnem Spiritus.

Doppelmesser sind entbehrlich.

### Mikrotome.

Vollkommnere, gleichmässigere und grössere Schnitte erhält man durch Anwendung der Mikrotome, von denen hauptsächlich die folgenden in Gebrauch sind:

1) Zerlegbare Cylindermikrotome aus Metall, mit einer Schlussplatte von Stahl. Dieselben bestehen aus einem Hohlcylinder, dessen Boden durch eine von unten wirkende Schraube gehoben werden kann, und der mit dieser Hebung dann auch das Präparat nach oben verschiebt. Der Cylinder ist oben mit einer Schlussplatte versehen. Das Messer wird beim Schneiden — es eignet sich dazu jedes doppelt hohlgeschliffene Rasirmesser mit gerade verlaufender Klinge — mit Alkohol befeuchtet, auf die Schlussplatte aufgelegt und ohne Druck über dieselbe so hingezogen, dass seine ganze Schneide, vom Anfang bis zum Ende, zur Wirkung kommt. Brauchbar für den Arzt ist nur ein zerlegbares Mikrotom, bei welchem der Durchmesser des Hohlcylinders 12—18 mm, der Durchmesser der Schlussplatte vom Rand derselben bis zur centralen Oeffnung etwa 12 mm beträgt. Bei einem solchen Instrument lässt sich jedes Rasirmesser mit gerade verlaufender Schneide verwenden, während eine grössere Schlussplatte oder eine grössere Cylinderweite eigens construirte Messer erfordern.

Das Cylindermikrotom dient nur zum Schneiden gehärteter Präparate. Vertragen dieselben, wie dies meist der Fall ist, eine gewisse Compression, ohne dass sie sich dabei erheblich verändern, so bettet man sie in ein Stück Amyloidleber oder Hollundermark ein, welches so zugeschnitten ist, dass es in den Hohlcylinder gerade hineinpasst, und schliesst das Ganze zwischen den beiden auseinandergenommenen Hälften des Hohlcylinders ein.

Darf das Präparat nicht gepresst werden, so giesst man in den geschlossenen Hohlcylinder so viel durch Erwärmen flüssig gemachtes Solarparaffin ein, als nothwendig ist, um den Boden des Cylinders zu bedecken. Dann bringt man das Stück in den Hohlraum und füllt nun den seitlich vom Präparat und über demselben frei bleibenden Hohlraum mit flüssigem Paraffin aus. Es handelt sich hier also um eine einfache Umgiessung des Präparats mit Paraffin, nicht um eine gleichzeitige gründliche Durchtränkung, wie bei der Einbettung.

Uebrigens kann man das Anhaften des Paraffins am Präparat noch dadurch befördern, dass man zuvor das letztere für einige Stunden in ein Lösungsmittel des Paraffins: Xylol, Benzin, Bergamottöl u. s. w. einlegt. Mit denselben Reagentien wird nachher aus den einzelnen Schnitten das Paraffin wieder entfernt.

Cylindermikrotome mit Halter zum Befestigen am Tisch sind nicht praktisch; ebenso sind Mikrotome mit unzerlegbarem Cylinder und solche, bei denen die Schlussplatte mit Glas verkleidet ist, nicht zu empfehlen.

2) Die Schlittenmikrotome sind viel vollkommnere Instrumente. Die Schnitte werden dünner, gleichmässiger, und man kann viel grössere Schnitte mit ihnen anfertigen.

Bei den Schlittenmikrotomen wird das Messer in einem Schlitten geführt, der auf drei, ganz glatt polirten und gut geölten Schienen hin und her bewegt wird.

Das Präparat wird entweder von unten nach oben direct in einer Klammer durch eine Schraube in die Höhe gehoben, oder es kommt dadurch langsam um eine gewisse Anzahl von Theilstrichen in die Höhe, dass es auf einer schiefen Ebene durch Schraubenvorrichtung langsam vorgeschoben wird.

Das Präparat wird dabei entweder direct in einer Klammer oder in einer cylinderartigen, zu seiner Aufnahme bestimmten Vorrichtung

befestigt, und man kann sich dabei der mehrfach erwähnten Einklemmung in Amyloidleber oder Hollundermark bedienen (s. p. 21); oder man klebt das Präparat auf einem Kork fest, der dann seinerseits in die Klammer eingeschraubt wird.

Bei dem letzteren Verfahren, welches das allgemeiner gebräuchliche ist, schneidet man sich eine flache Scheibe aus dem betreffenden Object zurecht und klebt sie auf den vorher mit einem Messer rauh gemachten Kork mit sog. flüssigem Leim auf. Dann kommt der Kork auf einige Stunden in absoluten Alkohol oder starken Spiritus, in dem die Leimmasse erstarrt und fest wird.

Schneller und sicherer erreicht man das Festkleben noch mit einer Glyzeringelatinemischung: man lässt Gelatine einige Stunden in Wasser aufquellen, giesst dann das Wasser ab und kocht die aufgequollene Gelatine mit dem gleichen Volumen Glyzerin, dem man gegen spätere Schimmelbildung etwas Campher oder noch besser eine Spur Sublimat zugesetzt hat. Die flüssige Masse wird durch Leinwand filtrirt und erstarrt dann. Zum Gebrauch macht man jedesmal ein erbsengrosses Stückchen derselben auf einem sog. Kartoffelmesser über der Flamme flüssig, bringt nun den flüssigen Tropfen auf den Kork und setzt das Präparat darauf. In Alkohol wird dann die Masse sehr rasch starr und fest.

Es muss durchaus davor gewarnt werden, die Stücke die man auf Kork aufkleben will, zu hoch auszuschneiden. Dieselben sollen nicht höher als 8 mm sein, weil sie sich sonst leicht vor dem Messer etwas ausbiegen.

Als Messerstellung empfiehlt sich für die Mehrzahl der Fälle eine möglichst spitzwinklige Richtung der Klinge zum Präparat, so dass die ganze Klinge zur Wirkung kommt und ausgenutzt wird. Nur bei sehr kleinen und sehr harten Präparaten kann die Stellung des Messers sich mehr der senkrechten nähern. Allgemein gültige Regeln lassen sich übrigens schwer geben; oft muss man verschiedene Stellungen des Messers durchprobiren, bis man die für das betreffende Präparat passende gefunden hat.

Auch bei den Schlittenmikrotomen müssen das Messer und das Präparat stets mit Spiritus befeuchtet sein, den man mit einem Pinsel aufträgt. Besondere Tropfvorrichtungen werden zwar jetzt in mancherlei Form zu den einzelnen Mikrotomen construirt, sind aber entbehrlich.

Man entfernt die Schnitte von dem Messer mittels eines feinen Pinsels und überträgt sie in eine Schale mit Wasser oder verdünntem Spiritus. Auch mit einer biegsamen, vorn stumpfen silbernen Nadel lassen sich die Schnitte sehr gut abnehmen. Man darf mit derselben natürlich nicht die Schneide des Messers berühren.

Paraffinpräparate müssen trocken geschnitten werden. Dabei rollen sich dieselben leicht auf. Es sind daher verschiedene Vorrichtungen, sog. Schnittstrecker, angegeben worden, um dieses Aufrollen zu verhindern, z. B. ein hakenförmig umgebogener, am Messer befestigter Draht, dessen vorderer Theil sich über das Präparat hinlegt. Am einfachsten verhindert man das Aufrollen der Paraffinschnitte durch Auflegen eines schmalen, bandförmigen Streifens Cartonpapier (Visitenkarte), mit dem die linke Hand den Schnitt an die Fläche des Messers andrückt. Auch ein kleiner Hornspatel kann ähnlich gebraucht werden.

3) Das Gudden'sche Mikrotom ermöglicht es, die Schnitte unter Wasser anzufertigen, was namentlich bei sehr grossen Gehirn-

schnitten erwünscht sein kann. Dasselbe ist so eingerichtet, dass das betreffende Präparat in einem Metallcylinder durch einen Stempel in die Höhe gehoben wird. Dieser Metallcylinder befindet sich mit dem Messer in einer Wanne mit Wasser. Zum Befestigen des Stückes in dem Cylinder dient eine Umgiessungsmasse von

| | |
|---|---|
| Stearin | 12 Theile, |
| Schweinefett | 12 Theile. |
| Wachs | 1 Theil. |

4) Die Gefriermikrotome verdienen eine gesonderte Besprechung. Bei denselben wird das Präparat auf die obere Fläche einer Metallplatte gelegt, gegen deren untere Fläche ein Aetherspray wirkt.

Die Stückchen für das Gefriermikrotom sollen nicht höher als 4 mm sein, weil sie sonst schwer und ungleich frieren. Das Präparat muss, bevor man es zum Frieren bringt, vollständig durchwässert sein und darf keine Spur von Spiritus mehr enthalten. Die Durchwässerung wird bei einer Temparatur von 30° schneller bewirkt, als bei gewöhnlicher Temperatur. Im Allgemeinen thut man aber gut, Präparate, die in Spiritus gehärtet waren, wenigstens eine Nacht lang in einer reichlichen Menge von Wasser liegen zu lassen. Celloidinpräparate, die in 80-proc. Spiritus gelegen hatten, müssen ebenfalls für wenigstens 12 bis 24 Stunden in reichliche Mengen von Wasser übertragen werden. Stücke, die in Müller'scher Flüssigkeit liegen, können direct, oder nachdem sie nur kurze Zeit in Wasser gelegt sind, auf dem Gefriermikrotom geschnitten werden. Auch Präparate aus Formalinlösung können direct geschnitten werden. Eine Nachhärtung in Spiritus ist für das Gefriermikrotom nicht nothwendig.

Das Präparat wird, bis es angefroren ist, mit einem Scalpellstiel leicht gegen die Platte angedrückt. Wenn das Präparat nicht fest anfriert, so liegt der Grund meistens darin, dass es nicht ganz von Spiritus befreit ist, und man bringt dasselbe dann noch einmal für einige Stunden in Wasser zurück; oft kann man sich auch dadurch helfen, dass man an diejenige Stelle, wo sich zwischen Präparat und Metallplatte ein spaltförmiger Raum zeigt, mit dem Nadelstiel noch einen Tropfen Wasser bringt. Auch kann man die untere Fläche des Präparats mit einer dünnen Schicht flüssigen Leims bestreichen. Das Stück soll vollständig durchfroren sein, es darf aber andererseits nicht zu hart sein, sonst fasst das Messer nicht ordentlich, und es erhalten oft auch die einzelnen Schnitte ein streifiges Aussehen.

Das Object legt man auf der Platte des Gefriermikrotoms so auf, dass das Messer das Präparat zunächst an einer Ecke, nicht von einer ganzen Seite aus fasst.

Man überträgt die Schnitte vom Messer am besten zunächst in dünnen, etwa 80-proc. Spiritus, weil sie sich dann später besser aufrollen, als wenn man sie direct in Wasser bringt.

Die Gefriermikrotome haben für frische, der Leiche entnommene Stücke nur einen bedingten Werth, weil bei dem Gefrieren die Structur der Gewebe so bedeutende Veränderungen erleidet, dass man von der Vornahme einer feineren Untersuchung meist absehen muss. Sehr brauchbar ist das Gefriermikrotom dagegen zur Anfertigung von Schnitten bei Stücken, die in Müller'scher Flüssigkeit vollkommen ausgehärtet sind. Diese werden durch das Frieren gar nicht verändert, und es ist das Verfahren andererseits sehr bequem, weil gar

keine Vorbereitungen, wie Aufkleben auf Kork etc., nöthig sind. Ausserdem erhält man mit dem Gefriermikrotom viel feinere und gleichmässigere Schnitte als mit jedem anderen Mikrotom. Die Conservirung in Formalin gestattet ebenfalls sofortiges Schneiden auf dem Gefriermikrotom.

Von Spirituspräparaten erhält man auf dem Gefriermikrotom oft gute Schnitte, wenn die Stücke vorher sorgfältig in Celloidin eingebettet waren.

Bezugsquellen für Mikrotome:

Mechaniker Becker, Göttingen.
„ Jung, Heidelberg.
Instrumentenmacher Katsch, München.
Dr. Long, Berlin.
Mechaniker Schanze, Leipzig.

## Serienschnitte.

Eine besondere Technik erfordert die Anfertigung von Serienschnitten.

1) Für Celloidinpräparate bedient man sich dazu am besten des Weigert'schen Verfahrens. Man schneidet sich schmale Streifen von Closetpapier, deren Breite den Durchmesser der aufzulegenden Schnitte etwa um das Doppelte übertrifft. Der Schnitt wird nun, wenn er sich nicht von selbst dicht an die Schneide des Messers anlegt, vorsichtig mit der Nadel dorthin gerückt. Dann legt man den Papierstreifen von oben her auf den Schnitt und zieht ihn mit letzterem wagerecht oder ein klein wenig nach oben abhebend in der Richtung der Messerfläche nach links hin fort. Das Abziehen gelingt aber nur, wenn der Schnitt nicht in gar zu viel Spiritus schwimmt. Der nächste Schnitt kommt auf dem Papierstreifen immer an die rechte Seite des vorigen. Die Streifen müssen nun, während die einzelnen Schnitte aufgelegt werden, namentlich aber auch dann, wenn sie die entsprechende Anzahl von Schnitten aufgenommen haben und weitere Streifen präparirt werden, feucht gehalten werden. Zu dem Zwecke stellt man neben dem Mikrotom einen flachen Teller auf, der mit einer einfachen Lage von spiritusdurchtränktem Fliesspapier und darüber mit einem Blatt Closetpapier versehen ist. Auf dieses legt man die einzelnen Streifen so, dass die Präparate nach oben sehen.

Ist das ganze Stück geschnitten, so bringt man jeden Papierstreifen, die Präparate nach unten, auf eine Glasplatte, die man vorher mit einer dünnen Collodiumschicht bedeckt hat, und drückt ihn dort ganz sanft an. Dann gelingt es leicht, die Papierstreifen so abzuziehen, dass die Schnitte in richtiger Reihenfolge auf der Collodiumschicht haften bleiben. Ist noch Flüssigkeit auf der Oberfläche vorhanden, so entfernt man diese, ohne jedoch die Schnitte ganz trocken werden zu lassen. Sofort bedeckt man dann die Schnitte mit einer zweiten, ebenfalls dünnen und gleichmässigen Collodiumschicht und stellt dann die Platte auf die Kante, um die folgenden weiter zu behandeln. Man markirt dann noch die Reihenfolge der Schnitte durch einen feinen in Methylenblau getauchten Stift.

Bringt man nun die so behandelten Glasplatten in Färbeflüssigkeit — es ist zunächst die Weigert'sche Hämatoxylinlösung zur Färbung des Centralnervensystems vorgesehen — so lösst sich sehr bald die ganze Collodiummasse mit den eingeschlossenen Schnitten von der Unterlage ab.

Nach beendeter Färbung kann man die Collodiumplatten in passender Weise unter Wasser mit der Scheere zerschneiden; sie kommen dann in 96-proc. (nicht absoluten!) Alkohol. Die Schnitte dürfen nicht in Nelkenöl aufgehellt werden, und da auch Origanumöl wegen seiner grossen Empfindlichkeit gegen Wasserreste unbequem ist, so hellt man die Schnitte auf in einer Mischung von Xylol 3, Acidum carbolic. pur. 1. Auf den Boden der Flasche, in der man diese Mischung, die immer wieder gebraucht werden kann, aufbewahrt, bringt man etwas ausgeglühtes weisses Kupfervitriol. Wenn sich dasselbe bläut, wird es durch neues ersetzt oder von neuem ausgeglüht.

2) Serienschnitte von Paraffinpräparaten fertigt man in der Weise an, dass man die Schnitte in bestimmter Reihenfolge auf Objectträgern aufklebt, die mit einer Mischung von Nelkenöl und Collodium 3: 1 bestrichen sind. Das weitere Verfahren, Entfernung des Paraffins, Färben etc. ist dasselbe, wie p. 20 angegeben wurde. Die einzelnen Objectträger kann man numeriren. Sind die Präparate nicht vorgefärbt, so färbt man auf dem Objectträger. Ein dem Weigert'schen nachgebildetes Verfahren, welches sich dann empfiehlt, wenn die Schnitte so gross sind, dass man nicht eine ganze Anzahl derselben auf einem Objectträger unterbringen kann, hat Strasser angegeben.

Man stellt sich Papiergummicollodiumplatten her, welche die Rolle der Weigert'schen Collodiumglasplatten übernehmen, indem man gut ausgespanntes Schreibpapier mit einer Mischung von 4 Theilen des officinellen Mucilag. Gumm. Arabic. und 1 Theil Glycerin bestreicht. Ist das Papier trocken geworden, so streicht man möglichst schnell Collodium darüber, welches bis zur Consistenz des gewöhnlichen Glyzerins durch Aether verdünnt ist, und dem $^1/_{100}$ Volumtheil Ricinusöl zugesetzt ist. Dieser Anstrich wird mehrmals wiederholt. Vor dem Schneiden des Paraffinstückes wird nun auf die so beschaffene Papiergummicollodiumplatte eine Klebemasse aufgetragen von

| | | |
|---|---|---|
| Collodium | 2 | Volumtheile |
| Aether | 2 | „ |
| Ricinusöl | 3 | „ |

Die Schnitte werden möglichst glatt auf diese Klebemasse aufgelegt und dann mit ebenderselben Klebemasse bedeckt.

Zur Entfernung des Paraffins werden nun die Platten für eine halbe bis mehrere Stunden in Terpentinöl gebracht und von da in Chloroform übertragen. Aus dem Chloroform kommen die Platten noch 15 Minuten in 80-proc. — 85-proc. Alkohol. Bringt man nun die Platten vor der Färbung in Wasser oder 10-proc. Spiritus, so löst sich der Gummi und mit ihm die Papierplatte ab, und es kann dann in derselben Weise verfahren werden, wie bei der Weigert'schen Methode. Selbstverständlich kann die Entfernung des Papiers nur in wässeriger Farbstofflösung vor sich gehen.

3) In neuester Zeit hat Darkschewitsch eine verhältnissmässig einfache Methode angegeben, um Schnittserien anzufertigen und in ihrer Reihenfolge aufzubewahren.

Ein Glascylinder oder ein Glasgefäss von dem ungefähren Umfang der zu bearbeitenden Schnitte wird mit Spiritus gefüllt. Darauf schneidet man sich aus Löschpapier Scheiben von solcher Grösse, dass sie gut in das Glasgefäss passen. Diese Scheiben werden mit einem

gewöhnlichen Bleistift numerirt, der Reihenfolge nach gelegt und gut mit Spiritus durchtränkt. Jeder Schnitt wird nun in der Weise von dem Messer des Mikrotoms entfernt, dass man das Löschpapier sanft aufdrückt und dann abzieht. Die Papierscheiben werden dann, die Schnittseite nach oben, in dem Glascylinder in der richtigen Reihenfolge säulenförmig über einander gelegt, so dass jeder Schnitt auf dem mit der entsprechenden Nummer versehenen Papierstück liegt.

Es können die Schnitte beliebig lange aufgehoben werden. Will man färben, so entfernt man den Spiritus, spült eventuell noch mit destillirtem Wasser nach und giesst dann die Farbstofflösung auf. Ebenso verfährt man im weiteren Verlauf mit den anderen etwa anzuwendenden Reagentien. Die Letzteren können auch auf flachen Tellern zur Einwirkung gebracht werden. Die Schnitte lösen sich von selbst nicht wieder von ihrer Unterlage ab.

Auch viereckige Glaskasten, die in eine grosse Anzahl kleinerer Quadrate abgetheilt sind, kommen zur Verwendung, um Serienschnitte anzufertigen.

---

## Achtes Capitel.

## Behandlung mikroskopischer Präparate mit Reagentien und Färbemitteln.

Wenn man Schnitte von gehärteten Präparaten im ungefärbten Zustande untersucht, so können zur Erleichterung der Untersuchung alle bei der Untersuchung frischer Präparate in Cap. II angeführten Reagentien zur Anwendung kommen. Die Untersuchung wird in reinem Glyzerin oder in mit der Hälfte Wasser verdünntem Glyzerin vorgenommen.

Als Isolationsmethoden für Schnitte sind noch das Auspinseln oder Ausschütteln und die künstliche Verdauung zu erwähnen.

Die Methode des Auspinselns oder Ausschüttelns kommt namentlich in Betracht, wenn man den bindegewebigen Stützapparat von drüsigen Organen, oder wenn man das Stroma von Geschwülsten, besonders von Carcinomen, isolirt, nach Entfernung der Zellen untersuchen will.

Beim Auspinseln verfährt man so, dass man den auf dem Objectträger ausgebreiteten Schnitt an einer Seite mit der Präparirnadel festhält und nun mit einem feinen Pinsel vorsichtig und wiederholt von der Nadel an nach der entgegengesetzten Seite hinfährt und so nach und nach alle Zellen entfernt. Man kann auch, genau in derselben Weise, das Auspinseln in einem Schälchen mit Wasser vornehmen

Zum Ausschütteln bringt man den Schnitt in ein Reagenzglas welches zum Theil mit Wasser gefüllt ist, und schüttelt so lange, bis die Zellen ausgefallen sind.

Bei der Methode der künstlichen Verdauung, die übrigens eine ausgedehntere Verwendung in der pathologisch-histologischen Technik nicht gefunden hat, setzt man die Schnitte oder Stückchen mehrere Tage lang bei Brütofentemperatur der Einwirkung einer Trypsinlösung aus. Dann werden die Objecte in einem Reagenzglas mit Wasser ordentlich geschüttelt und schliesslich in Kochsalzlösung untersucht.

Die Trypsinlösung stellt man sich in der Weise her, dass man ein frisches Rinderpankreas im Extractionsapparat so lange mit Alkohol und

Aether behandelt, bis eine weisse, leicht zerreibliche Masse zurückbleibt. Von dieser Masse wird ein Theil in 5—10 Theile 0,5-proc. Salicylsäurelösung 3—4 Stunden lang bei 40° C. gebracht und dann filtrirt.

Durch das Trypsin werden die Zellen und die Kittsubstanz in den Geweben zerstört, während die fibrillären Bestandtheile erhalten bleiben.

### Allgemeines über die Färbetechnik. Weiterbehandlung und Conservirung der Schnitte nach der Färbung[1]).

Die moderne Färbetechnik beruht auf der Thatsache, dass die einzelnen Gewebe verschiedenen Farbstoffen gegenüber eine verschiedene Affinität zeigen, so dass durch Anwendung bestimmter Farbstoffe ein Gewebe gegenüber seiner Umgebung besonders hervorgehoben und deutlich gemacht werden kann.

Diese Affinität der einzelnen Gewebe zu bestimmten Farbstoffen tritt manchmal schon bei der einfachen Färbung hervor, indem nur eine bestimmte Gewebsart durch den Farbstoff überhaupt oder doch ganz vorzugweise gefärbt wird. In anderen Fällen nehmen bei der Färbung zunächst alle Gewebe eines Schnitts gleichmässig die Farbe an; es behält sie aber bei Anwendung bestimmter Entfärbungsmittel nur ein Gewebe, während die anderen, die vorher ebenfalls die Farbe angenommen hatten, diese wieder abgeben.

Von ganz besonderer Wichtigkeit ist die Thatsache, dass sich auch die Bestandtheile der einzelnen Zelle, Protoplasma und Kern, Farbstoffen gegenüber verschieden verhalten, und es spielen diejenigen Farbstoffe, die entweder ausschliesslich oder ganz vorzugsweise den Kern färben, während das Protoplasma ungefärbt bleibt oder nur einen ganz schwachen Farbenton annimmt, die sog. Kernfärbungsmittel, in der histologischen Technik eine hervorragende Rolle. Man kann die durch Färbungen erzielbare Differenzirung der Gewebe noch vermehren, wenn man Doppelfärbungen anwendet, d. h. nach einander oder auch gleichzeitig in ein und derselben Lösung zwei verschiedene Farben einwirken lässt, die entweder verschiedene Gewebe färben, oder die, wenn es sich hauptsächlich um Zellen handelt, Protoplasma und Kern mit verschiedenen Farben hervortreten lassen.

Für die Anwendung der Färbemittel lassen sich folgende allgemeine Grundsätze aufstellen:

1) Alle Farbflüssigkeiten müssen vor dem jedesmaligen Gebrauch filtrirt werden. Es ist deshalb praktisch, jede Flasche für sich mit einem kleinen Glastrichter, in dem ein Filter steckt, zu verschliessen. Dieses Filter kann dann für die betreffende Farblösung meist 4—6 Wochen lang gebraucht werden.

2) In der Farbflüssigkeit müssen die Schnitte möglichst ausgebreitet liegen, und es dürfen nicht mehrere Schnitte fest über einander liegen, weil sonst oft einzelne Stellen noch nicht hinreichend gefärbt sind, während andere Stellen, die ausgiebiger mit der Farblösung in Berührung gekommen sind, schon genügend oder sogar überfärbt sind. Es empfiehlt sich daher auch, die Schnitte in der Farblösung mit der

---

[1]) Bezugsquellen für Farben, sowie für die übrigen bei mikroskopischen Untersuchungen gebräuchlichen Reagentien sind ausser vielen anderen: Dr. Grübler, Leipzig, Bayersche Strasse; G. König, Berlin, Dorotheenstrasse 35.

Hämatoxylin und Karmin kann man auch aus den Apotheken beziehen.

Nadel oder durch Anblasen der Flüssigkeit vorsichtig hin und her zu bewegen. Vor allem ist es aber wichtig, dass man hinreichend grosse Schalen und reichliche Menge von Färbeflüssigkeit anwendet, die nach dem jedesmaligen Gebrauch zurückgegossen und aufbewahrt werden kann.

3) Die zur Erzielung einer guten Färbung nothwendige Zeit ist keine ganz unveränderliche; sie schwankt vielmehr immer innerhalb gewisser, wenn auch meist enger Grenzen. Es ist dabei nicht nur das Alter der Färbeflüssigkeit von Einfluss, indem ältere Färbeflüssigkeiten oft schneller und intensiver färben als frisch bereitete, sondern es spielt auch die Art der Härtung und Conservirung, sowie namentlich das Alter des Präparats eine Rolle. Aeltere Präparate färben sich oft langsamer und weniger intensiv als frischere. Schliesslich zeigen auch die Zellen der einzelnen Organe ein etwas verschiedenes Verhalten Farbstoffen gegenüber.

Man kann aber oft auch bei schwieriger zu färbenden Objecten die Färbung erreichen:

a) durch längere Einwirkung der Farblösung bis zu 24 Stunden;
b) durch stärkere Concentration der Farblösung;
c) durch Erwärmen der Farblösung, namentlich durch längeres Färben bei Brütofentemperatur.

4) Das Auswaschen der Schnitte, meist in destillirtem Wasser, muss auf das sorgfältigste und so lange vorgenommen werden, bis das Wasser keinen Farbstoff mehr annimmt. Auch nach dem Auswaschen ist es oft nützlich, die Schnitte noch mehrere Stunden lang in reichlichem destillirtem Wasser zu belassen.

Die Schnitte werden dann, abgesehen von einzelnen Ausnahmen, entweder in **Glyzerin** oder in **Kanadabalsam** untersucht und conservirt. Damarharz ist als Einschluss nicht zu empfehlen, namentlich nicht für Hämatoxylinpräparate. In Glyzerin kann der Schnitt sofort aus dem destillirten Wasser übertragen werden. Hämatoxylinpräparate müssen aber erst längere Zeit ausgewaschen sein, ehe man sie in Glyzerin einlegen kann. Man bedient sich auch hier zur Uebertragung passend des Spatels. Das überflüssige Wasser wird mit Fliesspapier abgesaugt. Oft ist es bequem, zunächst den Schnitt in Wasser auf den Objectträger zu bringen, dieses mit Fliesspapier zu entfernen und dann erst Glyzerin zuzugeben. Man kann so die nöthige Menge des Glyzerins besser bemessen.

Will man den in **Glyzerin** eingelegten Schnitt aufbewahren, so muss man ihn von der Luft abschliessen. Zu dem Zwecke umzieht man den Rand des Deckglases zunächst mit Wachs, indem man mit dem Docht eines eben ausgelöschten Wachslichtes über die Ränder fährt. Es hinterlässt dann der noch warme Docht, in dem sich flüssiges Wachs befindet, einen ganz schmalen Streifen von sofort erstarrendem Wachs. Wenn das Deckglas Neigung hat, sich bei dieser Procedur zu verschieben, so kann man zunächst die vier Ecken durch Auftropfen mit dem Docht fixiren.

Bedingung für das Gelingen der Wachsumrandung ist, dass an den Rändern des Deckglases kein überschüssiges Glyzerin hervorquillt; wenn dies der Fall ist, so muss dasselbe vorher mit einem in absoluten Alkohol eingetauchten Leinwandläppchen weggewischt werden.

Auch wenn während des Umziehens mit Wachs noch Glyzerin an irgend einer Stelle hervorquillt, muss dasselbe entfernt werden.

Will man die Präparate längere Zeit aufheben, so überzieht man den Wachsrand noch mit dem käuflichen Asphalt- oder mit Maskenlack. Es muss dieser den Wachsrand nach beiden Seiten überragen, derart, dass er sowohl dem Objectträger wie dem Deckglas direct aufliegt. Der Wachsrand darf daher nur ganz schmal sein. Dagegen ist es nicht rathsam, das Deckglas direct, ohne vorherige Wachsumrandung, mit Lack zu umziehen, weil derselbe eine Zeit lang flüssig bleibt und vermöge der Capillarität unter das Deckglas vordringen kann.

Es giebt noch eine grosse Menge von Recepten zu besonderen Lackeinschlüssen; man reicht mit Asphalt- oder Maskenlack aber um so mehr aus, als der Einschluss von Präparaten in Glyzerin in der pathologischen Histologie überhaupt selten angewandt wird.

Schnitte, die in Anilinfarben gefärbt sind, sollen nicht in Glyzerin conservirt werden, weil dasselbe die Anilinfarben nach und nach auszieht. Eine Ausnahme machen nur die mit Bismarckbraun oder mit specifischen (Anilin-)Amyloidreactionen gefärbten Schnitte.

Bei dem Einschluss in **Kali aceticum** (gesättigte Lösung) ist das Verfahren dasselbe. Kali aceticum empfiehlt sich namentlich für Präparate, die mit Anilinfarben gefärbt sind, wenn der sonst immer vorzuziehende **Kanadabalsam** nicht zur Anwendung kommen kann. Auch Osmiumpräparate, durch welche Glyzerin gebräunt wird (cf. p. 13), werden in Kali aceticum eingelegt.

Der Einschluss in **Kanadabalsam,** der in Xylol gelöst ist, ist der in der pathologischen Histologie am meisten angewendete. Dazu ist es aber nothwendig, dass die Schnitte erst vollkommen entwässert sind, weil sie sich sonst in dem Kanadabalsam trüben.

Die Entwässerung geschieht so, dass man den Schnitt aus dem Wasser zuerst für 3—5 Minuten in den käuflichen 96-proc. Spiritus und dann ebenso lange in absoluten Alkohol bringt, dessen Menge sich natürlich nach der Anzahl der zu entwässernden Schnitte richtet. Da die Schnitte, die aus dem Wasser kommen, die Neigung haben, sich in starkem Spiritus zu kräuseln, so muss man sie in dem destillirten Wasser auf ein untergeschobenes Stückchen Fliesspapier aufziehen und mit diesem in Spiritus übertragen, oder man kann — was bequemer und weniger zeitraubend ist — die Uebertragung auf dem Spatel bewerkstelligen, indem man den Spatel im Alkohol unter dem Schnitt erst wegzieht, wenn derselbe etwas starr geworden ist. Etwas wird übrigens das Aufkräuseln des Schnittes auch schon dadurch verhindert, dass man denselben zunächst in 96-proc. und dann erst in absoluten Alkohol bringt und ihn hier sofort mit der Nadel ordentlich ausbreitet. Es ist diese Vorschrift entschieden mehr zu empfehlen, als direct absoluten Alkohol anzuwenden und diesen noch einmal zu wechseln.

Da der absolute Alkohol sich nicht gut direct mit dem Xylolkanadabalsam verbindet, so wird der Schnitt aus dem Alkohol zunächst noch für 1—3 Minuten in ein Reagens gebracht, welches einerseits sich mit dem Alkohol, andererseits aber auch gut mit dem Kanadabalsam verbindet, und welches weiterhin die zweite sehr wichtige Fähigkeit besitzt, die Präparate aufzuhellen und durchsichtiger zu machen.

Solche **Aufhellungsmittel** sind eine Reihe von ätherischen Oelen.

**Terpentinöl** wird jetzt nur noch selten angewandt. Es giebt Präparaten, die mit Berlinerblau injicirt sind, einen schönen Farbenton.

**Nelkenöl** ist sehr allgemein im Gebrauch. Es hat den Vortheil, dass es nicht so empfindlich gegen geringste Wasserreste ist, die sich noch im Schnitt befinden. Andererseits ist es bei Celloidinpräparaten nicht anwendbar, weil es das Celloidin sofort löst. Ausserdem hat es den Nachtheil, dass es Anilinfarben oft auszieht oder ihnen einen schmutzigen, matten Farbenton verleiht.

**Bergamottöl** hellt gut auf und ist auch für Celloidinpräparate zu gebrauchen; ebenso **Hopfenöl** (Ol. Origani cretic.), **Cedernholzöl** und **Lavendelöl.**

Für Präparate, die mit Anilinfarben behandelt sind, namentlich auch für Bakterienschnitte, ist das **Carbolxylol** (s. p. 29) sehr zu empfehlen. Doch kräuseln sich darin die Schnitte leicht.

Gewöhnlich genügt es, die Schnitte für 2—3 Minuten in dem Aufhellungsmittel zu belassen. Durch längeres Verweilen, eine halbe bis mehrere Stunden lang, kann man aber auch dickere Schnitte noch so durchsichtig machen, dass sie ganz gut mit starker Vergrösserung untersucht werden können.

Man kann den Schnitt in einem Tropfen Oel auf dem Objectträger ausbreiten. Hat man aber viele Schnitte einzulegen, so ist es bequemer, wenn man die Präparate aus dem Alkohol in eine Schale mit dem betreffenden Oel bringt und sie aus diesem dann mit dem Spatel auf den Objectträger überträgt. Dann wird das überschüssige Oel durch Fliesspapier vorsichtig entfernt, und schliesslich der Schnitt mit einem Tropfen Kanadabalsam bedeckt und ein Deckglas aufgelegt. Wenn der Kanadabalsam dickflüssig ist, so beschleunigt man seine gleichmässige Vertheilung dadurch, dass man den Objectträger ganz leicht über der Spiritusflamme erwärmt. Ist der Kanadabalsam dünnflüssig, so lässt man die Präparate einige Tage frei an der Luft, aber vor Staub geschützt, liegen, damit der Balsam eintrocknet.

Die verschiedenen Manipulationen, die ein zu färbender und in Kanadabalsam einzulegender Schnitt durchzumachen hat, sind also folgende:

1) Färben.
2) Auswachsen, gewöhnlich in destillirtem Wasser.
3) Uebertragung auf dem Spatel in 96-proc. Spiritus, 3—5 Minuten.
4) Uebertragung auf dem Spatel in absoluten Alkohol, 2—5 Minuten.
5) Uebertragung in ätherisches Oel.
6) Ausbreiten auf dem Objectträger.
7) Absaugen des überschüssigen Oels mit Fliesspapier.
8) Kanadabalsam; Bedecken mit Deckglas.
9) Eventuell leichtes Erwärmen des Objectträgers.

## Die Kernfärbungen.

**Hämatoxylinalaun:**

Bereitung: Die käuflichen Hämatoxylinkrystalle werden in einer geringen Menge absoluten Alkohols gelöst. Am besten ist es, wenn die Lösung ganz concentrirt ist und noch Krystalle im Ueberschuss enthält. Von dieser Lösung setzt man zu einer 1-proc. wässerigen Alaunlösung so viel zu, bis dieselbe ein hellblaues bis hellviolettes Aussehen hat. Darauf setzt man die Lösung offen dem Licht aus, wo sie unter der Einwirkung des Sauerstoffs in einigen Tagen eine gesättigte blaue Farbe annimmt. Dann ist sie zur Färbung geeignet. Als Maassstab für die Quantität der zuzufügenden alkoholischen Hämatoxylinlösung kann dienen,

dass eine gut färbende Hämatoxylinalaunlösung etwa $^1/_2$ — $^3/_4$ Proc. reines Hämatoxylin enthalten muss. Da die Lösung um so intensiver färbt, je älter sie wird, so ist es oft empfehlenswerth, sie nach einigen Wochen noch durch Zusatz von Alaunwasser weiter zu verdünnen.

Anwendung:

1) Färben 1—2—3 Minuten lang.
2) Auswaschen in reichlichem destillirtem Wasser.
3) In destillirtem Wasser 12—24 Stunden lang stehen lassen.
4) Alkohol — Oel — Kanadabalsam.

Das Hämatoxylin ist eines der sichersten und besten Kernfärbungsmittel, und seine Anwendung passt für die meisten Gewebe. Die Färbung der Schnitte erhält sich viele Jahre lang ganz unverändert. Die Kerne zeigen eine intensiv blaue oder mehr violette Färbung, das Protoplasma dagegen nur einen ganz blassbläulichen Farbenton.

Wenn die Hämatoxylinlösung noch frisch ist, so färben sich die Schnitte langsam; sie dunkeln aber, worauf immer Rücksicht zu nehmen ist, in Wasser stark nach. Wenn die Lösung älter ist, so färbt sie meist schon in 1, oft sogar schon in $^1/_2$ Minute, und es empfiehlt sich deshalb, den Effect der Färbung dadurch zu controliren, das man in kurzen Zwischenräumen einen Schnitt in destillirtes Wasser bringt, um zu sehen, wie stark die Färbung geworden ist. Zur vorläufigen Orientirung kann man einen Schnitt sofort nach dem Auswaschen in Glyzerin oder nach vorheriger Entwässerung in einen Tropfen Nelkenöl bringen und untersuchen. Wenn es aber die Zeit irgendwie erlaubt, so muss man die Schnitte, nachdem sie sorgfältig ausgewaschen sind, noch wenigstens 12 Stunden im Wasser lassen. Durch das Auswässern wird die Farbe fixirt, während sonst die Schnitte oft noch, wenn sie schon in Kanadabalsam eingebettet sind, nachdunkeln.

Sind die Schnitte in der Farblösung zu dunkel geworden, was namentlich bei älteren Lösungen vorkommen kann, so lässt sich ein Theil der Farbe dadurch wieder entfernen, das man sie für eine bis mehrere Stunden in 1-proc. wässerige Alaunlösung zurückbringt. Danach ist es aber unbedingt nothwendig, die Schnitte wenigstens 12 Stunden in destillirtem Wasser zu belassen.

Der Contact mit Säure muss bei Hämatoxylinpräparaten sorgfältig vermieden werden.

Die Hämatoxylinalaunlösung hat eine verschieden lange Haltbarkeit, bis zu $^1/_2$ Jahr. Wenn ihr Farbenton ins Röthliche übergeht, ist sie nicht mehr brauchbar und muss dann frisch bereitet werden.

**Ehrlich's saures Hämatoxylin.**

Bereitung:

| | | |
|---|---|---|
| Hämatoxylin | 2,0 | |
| Alkohol absolut. | 60,0 | |
| Der Lösung hinzufügen: | | |
| Glyzerin | 60,0 | mit Alaun gesättigt. |
| destillirtes Wasser | 60,0 | |
| Eisessig | 3,0 | |

Anwendung:

1) Färben 4—5 Minuten lang.
2) Auswaschen in Wasser.
3) Alkohol — Oel — Kanadabalsam.

Die Ehrlich'sche Hämatoxylinlösung wird ebenfalls zunächst 2—3 Wochen dem Lichte ausgesetzt und dann filtirt. Sie überfärbt nicht leicht und ist sehr haltbar. Sonstige Vortheile besitzt sie aber vor der einfacher zu bereitenden Hämatoxylinalaunlösung nicht. Bei der letzteren erscheinen die Umrisse der Kerne entschieden schärfer.

**Heidenhayn's Hämatoxylinfärbung.**

1) Färben 24—48 Stunden lang in einer einfach wässerigen, in der Wärme hergestellten 0,5-proc. Hämatoxylinlösung.
2) Directe Uebertragung in eine $^1/_4$-proc. wässerige Lösung von einfach chromsaurem Kali 24—48 Stunden lang. Diese Lösung muss mehrmals gewechselt werden, bis keine Farbstoffwolken mehr abgehen.
3) Sehr sorgfältiges Auswaschen in Wasser.

Die Methode giebt sehr scharfe Bilder und eignet sich namentlich auch zum Durchfärben ganzer Stücke, die dann nach dem Auswaschen in Wasser in Alkohol von steigender Concentration gehärtet und schliesslich eingebettet werden. Die Präparate erscheinen dunkelschwarz, die Schnitte dürfen daher nicht zu dick sein.

Apathy hat eine Modification der Heidenhain'schen Methode angegeben, welche den langen Contact des Objects mit wässeriger Lösung vermeiden soll. Er wendet 0,5-proc. alkoholische Lösung von Hämatoxylin an und ebenso eine alkoholische Lösung von doppelt chromsaurem Kali, die dadurch bereitet wird, dass man zu einer 5-proc. wässerigen Lösung von doppeltchromsaurem Kali das doppelte Volum von absolutem Alkohol hinzufügt.

Sonst ist das Verfahren dasselbe wie bei der Heidenhain'schen Methode.

**Alaunkarmin.**

Bereitung: 2—5 g Karmin werden mit 100 g 5-proc. Alaunlösung $^1/_2$—1 Stunde lang gekocht. Nach dem Erkalten wird filtrirt.

Anwendung:

1) Färben 10 Minuten bis 2 Stunden lang.
2) Auswaschen in Wasser.
3) Alkohol — Oel — Kanadabalsam.

Die Kerne werden durch Alaunkarmin schön violettroth gefärbt. Dabei tritt, was gegenüber der Hämatoxylinlösung von Vortheil ist, keine Ueberfärbung ein, auch wenn die Schnitte mehrere Stunden lang in der Farbe liegen. Das Auswaschen erfordert nicht so viel Zeit wie bei der Hämatoxylinlösung, und die Farbe ist schliesslich nicht so empfindlich gegen Säure. Für schwer färbbare Objecte ist sie dagegen nicht zu empfehlen.

**Lithionkarmin.**

Bereitung: Karmin 2,5—5,0.
Gesättigte wässerige Lösung von Lithion carbonicum 100,0.

Anwendung:

1) Färben 2—3 Minuten lang.
2) Auswaschen $^1/_2$—1 Minute lang in Salzsäurespiritus = conc. Salzsäure 1,0 + 70 proc. Alkohol 100,0.
3) Entsäuern in reichlichem destillirtem Wasser.
4) Alkohol — Oel — Kanadabalsam.

Die Lithionkarminfärbung verleiht dem Kern eine intensiv rothe Farbe. Sie ist ein sehr sicheres Kernfärbemittel, welches auch bei

schwer färbbaren Objecten schnell und sicher wirkt. Handelt es sich übrigens um solche, so kann man den Karmingehalt der Lösung bis auf 5 Proc. steigern und die Farbe bis zu 12 Stunden einwirken lassen. Ein weiterer Vortheil besteht in der sehr einfachen Zubereitungsweise. Eine Ueberfärbung ist nicht möglich, weil man durch längeres Auswaschen in Salzsäurespiritus beliebig viel Farbe ausziehen kann. Andererseits muss bei der Wahl dieser Färbung immer die Anwendung der Salzsäure mit in den Kauf genommen werden. Die Lithionkarminfärbung eignet sich auch gut für Präparate, die mit einer blauen Injectionsmasse injicirt sind.

**Boraxkarmin.**

Bereitung: Karmin 0,5
Borax 2,0
Aqua destillata 100,0

gemischt und bis zum Kochen erwärmt. Unter fortwährendem Umrühren wird zugesetzt

Acid. acetic. dilut. (Pharm. Germ.) 4,5.

Dann 24 Stunden stehen lassen und filtriren.

Anwendung:

1) Färben 5—15 Minuten lang.
2) $^1/_2$—1 Minute lang Auswaschen in Salzsäurespiritus [Salzs. 1, Spiritus (70 Proc.) 100].
3) Gründliches Entsäuern in Wasser.
4) Alkohol — Oel — Kanadabalsam.

Boraxkarmin giebt eine ähnliche Färbung wie Lithionkarmin; die Farbe ist aber nicht ganz so intensiv.

**Pikrokarmin.**

Bereitung: Karmin 1,0
Liquor. Ammon. caust. 5,0
Aqua destillata 50,0

Nach erfolgter Lösung zugesetzt:
Gesättigte wässerige Pikrinsäurelösung 50,0.

Man lässt die Färbeflüssigkeit in einem weiten, offenen Gefäss stehen, bis alles Ammoniak verdunstet ist. Dann filtrirt man.

Anwendung:

1) Färben 1 Stunde lang.
2) Auswaschen $^1/_2$ Stunde lang in 1-proc. Salzsäureglyzerin, das durch Pikrinsäurezusatz leicht gelb gefärbt ist.
3) Auswaschen 5 Minuten lang in Wasser, das durch Pikrinsäure leicht gelb gefärbt ist.
4) Entwässern in durch Pikrinsäure gelb gefärbtem Alkohol.
5) Oel — Kanadabalsam.

Die Pikrokarminlösung hat, wenn man in der angegebenen Weise verfährt und dem Glyzerin, Wasser und Alkohol etwas Pikrinsäure zusetzt, den Vortheil, dass sie eine haltbare Doppelfärbung giebt, indem die Kerne braunroth erscheinen, während das Protoplasma gelb gefärbt wird. Ein weiterer Vortheil besteht darin, dass auch hyalin und colloid degenerirte Gewebe einen intensiv gelben Farbenton annehmen. Auch das Protoplasma der quergestreiften Muskeln und Hornsubstanz treten durch ihre deutliche Gelbfärbung stark hervor.

Zu bemerken ist noch, dass die von Dr. Grübler in Leipzig bezogene Weigert'sche Pikrokarminlösung sehr zuverlässig wirkt.

**Pikrolithionkarmin.**

Bereitung: Zu der oben angegebenen (p. 36) Lithionkarminlösung werden 2 Theile gesättigte wässerige Pikrinsäurelösung hinzugesetzt.

Anwendung: Wie bei Pikrokarmin.

Pikrolithionkarmin giebt eine ganz ähnliche Färbung wie Pikrokarmin.

**Beale's Karmin.**

Bereitung: Karmin 0,6
Liquor. Ammon. caust. 3,75
Einige Minuten gekocht, dann zugesetzt:
Glyzerin 60,0
Aqu. destill. 60,0
Alkohol 15,0

Anwendung: Die Beale'sche Karminlösung wird vorzugsweise zur Durchfärbung ganzer Stücke angewandt. Zu dem Zwecke müssen die Stücke je nach ihrer Dicke 2—8 Tage in der Lösung verbleiben, danach werden sie in Wasser ausgewaschen, kommen zur Nachhärtung in Alkohol und werden dann eingebettet. Die einzelnen Schnitte können später sofort eingelegt werden.

**Bismarckbraun.**

Bereitung:

a) Entweder gesättigte wässerige, durch Kochen dargestellte Lösung = 3—4-proc., filtrirt.
b) Oder concentrirte alkoholische Lösung in 40-proc. Alkohol = 2—$1^1/_2$-proc.

Anwendung:

1) Färben 5 Minuten lang.
2) Auswaschen in starkem Spiritus.
3) Alkohol—Oel—Kanadabalsam.

Das Bismarckbraun verleiht den Kernen eine schön braune Farbe. Sind Bakterien in dem Gewebe vorhanden, so werden diese noch intensiver braun gefärbt. Das Protoplasma erhält einen hellbräunlichen Farbenton. Die wässerige und alkoholische Lösung wirken in gleicher Weise. Eine Ueberfärbung tritt nicht ein. Die mit Bismarckbraun gefärbten Präparate eignen sich besonders gut für die photographische Reproduction. Man kann statt in starkem Spiritus auch in Salzsäure-(1-proc.)spiritus auswaschen.

Ausser dem Bismarckbraun sind nur wenige Anilinfarben als Kernfärbemittel im Gebrauch, obschon die meisten als solche verwandt werden können. Sie färben an und für sich diffus; die Differenzirung der Kerne tritt erst durch Auswaschen in absolutem Alkohol ein. Die Färbung ist nicht so haltbar, wie die durch Hämatoxylin und die verschiedenen Karminlösungen bewirkte. Empfehlenswerth sind unter den Kernfärbungen mit Anilinfarben noch die mit Gentianaviolett und die Heidenhain-Biondi'sche Färbung, die der Ehrlich'schen Blutfärbung (s. p. 39) nachgebildet ist. Dieselbe ist aber nicht haltbar.

**Gentianaviolett.**

Bereitung: 1-proc. wässerige oder 1—2-proc. alkohol. Lösung.

Anwendung:

1) Färben 3—5 Minuten lang.

2) Auswaschen in Alkohol, bis der Schnitt eine hellblaue Farbe hat.
3) Absoluter Alkohol, Xylol, Kanadabalsam.

Oft wird die Kernfärbung noch deutlicher, wenn man den Schnitt aus der Farbe zunächst höchstens für $^1/_2$ Minute in eine $^1/_2$-proc. wässerige Essigsäurelösung bringt und dann erst in Spiritus auswäscht.

**Biondi-Heidenhain's Färbung.**

Bereitung: Gesättigte wässerige Orangelösung filtrirt, 100 ccm
Gesättigte Säure-Fuchsinlösung 20 „
Metylgrün 50 „

Zur Darstellung der einzelnen gesättigten Lösungen ist es nothwendig, dass man dieselben mit einem Ueberschuss von Farbstoff mehrere Tage stehen lässt. Die Lösung wird zur Färbung im Verhältniss 1:100 verdünnt und muss dann durch Essigsäurezusatz deutlich stärker roth werden. Auf Fliesspapier muss sie einen Fleck machen, der in der Mitte blaugrün, nach den Rändern zu aber orange erscheint. Wird die orange Zone von einer breiteren rothen umgeben, so enthält die Lösung zu viel Fuchsin. Wenn ältere Lösungen an Färbekraft eingebüsst haben, so kann man oft dieselbe dadurch wieder herstellen, dass man eine ganz minimale Menge von Essigsäure zugiebt. Man taucht einen Glasstab in Essigsäure, schwenkt ihn in der Luft einige Male hin und her und bringt dann den noch anhaftenden Rest von Säure zu der Farblösung

Am besten bezieht man die nach den Angaben von Heidenhain hergestellte Lösung von Dr. Grübler in Leipzig.

Anwendung:

1) Härtung in Sublimat (s. p. 11).
2) Färbung 6—24 Stunden lang in der verdünnten Lösung.
3) Kurzes Auswaschen in 90-proc. Alkohol.
4) Entwässern in absolutem Alkohol.
5) Xylol, Kanadabalsam.

In Theilung begriffene Kerne, sowie die fragmentirten Kerne der Leukocyten sind intensiv grünviolett, die ruhenden Kerne blau gefärbt, die rothen Blutkörperchen roth.

Die Methode eignet sich namentlich sehr gut für Präparate, die viele Leukocyten enthalten. Sie ist ursprünglich nur für Paraffinschnitte und für Färbungen auf dem Objectträger angegeben. Man kann aber auch einzelne Celloidinschnitte, ohne sie auf dem Objectträger zu fixiren, in der Lösung färben. Wenn die Schnitte sehr dünn sind, braucht man das Celloidin nicht vorher zu entfernen. Bei dickeren Schnitten wirkt dagegen seine Gegenwart störend, weil es sich nur theilweise entfärbt.

Für drüsige Organe empfiehlt Nikiforoff ganz besonders die von Ehrlich für Färbung der eosinophilen Zellen angegebene Farbenmischung:

Aurantia
Indulin
Eosin ana 2,0.
Glyzerin 30,0.

Die Stücke werden in Sublimat gehärtet; in Paraffin eingebettet; die Schnitte werden auf dem Objectträger gefärbt.

## Diffuse Färbungen und Doppelfärbungen.

Unter den Farben, welche die Grundsubstanz der Gewebe färben, sind namentlich das neutrale karminsaure Ammoniak, welches kurzweg als neutrales Karmin bezeichnet wird, und das Eosin zu nennen. Letzteres kommt sowohl in wässeriger wie in alkoholischer Lösung zur Anwendung. Man macht jedoch selten von einer isolirten diffusen Färbung der Gewebe Gebrauch. Dieselbe wird vielmehr meist als Doppelfärbung in Verbindung mit einem Kernfärbemittel, vor allem mit Hämatoxylin, angewandt.

**Neutrales Karmin.**

Bereitung: 5 g Karminpulver werden mit etwas überschüssigem Ammoniak zu einem rothen Brei verrieben, dann mit 200 g Wasser in einem offenen Kolben so lange gekocht, bis das Ammoniak verflüchtigt ist. Der Kolben bleibt offen stehen, bis er nach einigen Wochen einen rothen Bodensatz zeigt. Dann wird filtrirt. Die Flüssigkeit färbt mit zunehmendem Alter immer besser. Man filtrirt daher die gebrauchte Lösung immer wieder zurück.

Honegger empfiehlt folgende Bereitungsweise, durch welche die Flüssigkeit sofort färbekräftig werden soll: das Karminpulver wird mit nur soviel Ammoniak, als unumgänglich nothwendig ist, zu einem dicken Brei verrieben, dann an der Wand der Reibschale dünn vertheilt und dem Austrocknen überlassen; die so erhaltene Masse wird fein pulverisirt, noch etwa 24 Stunden lang der Luft ausgesetzt und dann in kaltem Wasser gelöst.

Anwendung: Von der concentrirten Farbflüssigkeit stellt man sich durch Einträufeln in Wasser eine hellrothe Lösung dar und färbt in dieser, bis die Schnitte eine deutlich rothe Farbe bekommen haben. Die Färbung gelingt am besten, wenn man die Schnitte lange Zeit, bis 12 Stunden, in einer sehr verdünnten Lösung liegen lässt. Bei Mangel an Zeit kann man die Färbung aber auch in einer concentrirten Lösung bewirken, in welcher der hinreichende Farbenton gewöhnlich in 20 bis 30 Minuten erreicht wird.

Danach wird gründlich in Wasser ausgewaschen.

Doppelfärbung mit Hämatoxylin und Karmin wird stets in der Weise vorgenommen, dass man zuerst mit Hämatoxylin und dann mit Karmin färbt. Nach der Hämatoxylinfärbung müssen die Schnitte mindestens 6, besser noch 12 Stunden ausgewässert werden. Dann erst wird in Karmin gefärbt und nochmals in Wasser sorgfältig ausgewaschen.

**Eosin,** wässerige Lösung.

Bereitung: Von einer concentrirten wässerigen oder spirituösen Lösung von Eosin tropft man so viel in eine Schale mit Wasser, dass eine hellrothe Färbung entsteht, die etwa 1 : 1000—1500 Eosin enthält.

Anwendung:

1) Färben, wenige Minuten, bis die Schnitte eine rothe Farbe haben.
2) Abspülen in Wasser.
3) Entwässerung in Alkohol; nicht länger, als nothwendig ist, weil der Alkohol das Eosin nach und nach wieder auszieht.
4) Oel (kein Bergamottöl), Kanadabalsam.

**Eosin,** alkoholische Lösung.

Bereitung: Von einer concentrirten alkoholischen Lösung von Eosin wird tropfenweise so viel in absoluten Alkohol gegeben, bis derselbe eine rosarothe Farbe angenommen hat.

Anwendung:

1) Färbung der vorher in 96-proc. Spiritus übertragenen Schnitte einige Minuten bis mehrere Stunden lang.
2) Auswaschen in 96-proc. Spiritus bis der gewünschte Farbenton vorhanden ist.
3) Alkohol, Oel, Kanadabalsam.

Die Zeit, in welcher die Eosinfärbung zu Stande kommt, ist sehr verschieden, so dass sich in dieser Beziehung bestimmte Regeln kaum geben lassen; manchmal ist eine Einwirkung der Farblösung bis 24 Stunden lang zweckmässig.

Die alkoholische Lösung des Eosins färbt gleichmässiger als die wässerige. Eosin färbt die rothen Blutkörperchen rosaroth bis kupferroth, namentlich in Präparaten, die in Formalin oder auch in Sublimat gehärtet sind. Der Gefässinhalt tritt deshalb an Eosinpräparaten besonders deutlich hervor. Ausserdem giebt es den Geweben eine diffus rothe Färbung. Das Eosin kommt deshalb für sich allein selten zur Anwendung; meist wird es bei Doppelfärbungen gebraucht, und zwar eignet es sich am besten zu Combinationen mit Hämatoxylin und mit Alaunkarmin. Auch zusammen mit Gentianaviolett kann es angewendet werden. Die Doppelfärbungen mit Eosin werden ebenfalls so ausgeführt, dass zuerst das Kernfärbungsmittel einwirkt und dann erst die Eosinlösung. Man tropft dann zu dem absoluten Alkohol, in dem die mit Hämatoxylin etc. gefärbten Präparate entwässert werden, das entsprechende Quantum alkoholischer Eosinlösung hinzu und wäscht noch einmal in reinem Alkohol aus. Manche nehmen auch die Färbung mit Eosin so vor, dass sie dem zur Aufhellung bestimmten Nelken- oder Origanumöl etwas Eosin zusetzen. Oft nimmt auch in unerwünschter Weise das Nelkenöl, wenn man viele Eosinpräparate in demselben aufgehellt hat, von selbst eine Eosinfärbung an, die sich dann allen weiteren Präparaten mittheilt.

Man hat auch zu Hämatoxylinlösungen direct Eosin zugesetzt, um in ein und derselben Lösung die Doppelfärbung zu erzielen. So kann man z. B. zu der EHRLICH'schen Hämatoxylinlösung (siehe p. 35) 0,5 Eosin zusetzen, um diesen Effect zu erreichen. Fs hat das Verfahren jedoch keine Vortheile vor der getrennten Färbung in Hämatoxylin und Eosin.

Von der Eigenschaft der **Pikrinsäure,** in wässeriger Lösung eine diffuse Färbung der Gewebe zu bewirken, macht man bei der oben angeführten Pikrokarminfärbung (s. p. 37) und bei der Färbung mit Pikrolithionkarmin (s. p. 38) Gebrauch. Weniger zweckmässig ist es, die Schnitte in einer kernfärbenden Karminlösung vorzufärben und sie dann in einer 1—5-proc. wässerigen Lösung von Pikrinsäure nachzufärben. Doch kann man so mit Alaunkarmin und Pikrinsäure in manchen Fällen ganz gute Doppelfärbung erzielen.

**VAN GIESON'sche Färbung.**

1) Härtung in MÜLLER'scher Flüssigkeit oder in Alkohol.
2) Färben $^1/_2$ Stunde lang in Hämatoxylin.
3) Gründliches Auswaschen in Wasser.

4) Färben 3—5 Minuten lang in einer Lösung von
Pikrinsäure, gesättigte wässerige Lösung,
Säurefuchsin, gesättigte wässerige Lösung so viel, dass die Mischung eine tiefrothe Farbe erhält.
5) Abspülen in Wasser, $^1/_2$ Minute lang.
6) Spiritus, Alkohol, Hopfenöl, Kanadabalsam.

Die Methode ist sehr bequem zu handhaben und giebt eine sehr schöne Doppelfärbung. Die Kerne werden braunroth, das Zwischengewebe leuchtend roth.

Ein weiterer Vortheil ist die gleichzeitige Färbung von Amyloid, Colloid, Hyalin und Schleim.

VAN GIESON hat ursprünglich die Hämatoxylinlösung von DELAFIELD empfohlen. Die gewöhnliche Alaunhämatoxylinlösung giebt aber sehr gute Resultate. Man überfärbt die Schnitte, weil die Pikrinsäure zum Theil eine entfärbende Wirkung ausübt.

## Färbung ganzer Stücke.

Eine besondere Art der Färbung besteht darin, dass man nicht einzelne Schnitte, sondern das ganze zu untersuchende Stückchen in toto färbt. Man wählt dazu mit Vorliebe Farbstofflösungen, denen ein Quantum Alkohol zugesetzt ist, so z. B. die BEALE'sche Karminlösung (s. p. 38). Auch das HEIDENHAIN'sche Hämatoxylin (s. p. 36) und Bismarckbraun (s. p. 38) eignen sich zum Durchfärben ganzer Stücke.

Als Regeln für eine derartige Durchfärbung ganzer Stückchen sind zu beachten:

1) Die betreffenden gehärteten oder fixirten Stückchen dürfen nicht zu voluminös sein, weil sonst die Farblösung zu schwer eindringt.
2) Die Färbung muss viel länger als bei der Schnittfärbung, 1—3—4—8 Tage lang, einwirken.
3) Gründliches Auswaschen, bis keine Farbe mehr abgeht.
4) Nachhärtung in 96-proc. Spiritus, resp. in absolutem Alkohol, bis das Object schnittfähig ist.

Die Durchfärbung ganzer Stücke hat den Vortheil, dass sie bequemer und viel weniger zeitraubend ist als die Färbung einzelner Schnitte. Ausserdem ist sie schonender, weil mit dem einzelnen Schnitt, der sofort eingelegt werden kann, nicht mehr so viele Manipulationen vorgenommen zu werden brauchen.

Trotzdem kann das Verfahren, welches in der normalen Histologie eine ausgedehnte Anwendung findet, für die Untersuchung pathologisch-anatomischer Präparate nicht so häufig in Betracht kommen, und die Grenzen seiner Verwendbarkeit dürften um so engere werden, je mehr es gelingt, bestimmte Farbenreactionen für bestimmte Gewebsveränderungen aufzufinden.

Nur selten kann man sich bei pathologisch-anatomischen Untersuchungen auf die Anwendung einer einzigen Färbungsmethode beschränken; in einem grossen Bruchtheil der Fälle ist neben der gewöhnlichen histologischen eine Färbungsmethode auf Bakterien nothwendig. Ebenso muss sehr häufig neben der gewöhnlichen Kernfärbung eine bestimmte Reaction auf degenerative Veränderungen, auf fettige Degeneration, auf Amyloid etc. angestellt werden. Aber selbst wenn es sich um eine rein histologische Untersuchung ohne complicirende Details handelt, kann man in vielen Fällen nicht im voraus beurtheilen, welche der zu Gebote stehenden Färbungsmethoden am sichersten zum Ziele führt. Auf der anderen Seite ist zu bemerken, dass die grössere

Schonung des einzelnen Schnitts, wie sie die Durchfärbung ganzer Stücke ermöglicht, gegenüber der so Vollkommenes leistenden Celloidineinbettung sehr an Bedeutung verloren hat.

## Darstellung der Kerntheilungsfiguren.

Die Darstellung der Kerntheilungsfiguren erfordert eine besondere Technik, deren Eigenthümlichkeiten sowohl die Art der Conservirung, wie die Methode der Färbung betreffen.

Erster Grundsatz ist, dass die zu untersuchenden Stückchen unmittelbar dem eben getödteten Thier entnommen und sofort in die betreffende Fixirungsflüssigkeit übertragen werden. Spätestens müssen dieselben eine halbe Stunde nach der Tödtung des Thieres oder nach der Entnahme aus dem lebenden Körper in die Fixirungsflüssigkeit kommen. Im anderen Falle läuft der Process der Kerntheilung ab, ohne dass es möglich ist, die Figuren der noch in der Theilung begriffen gewesenen Kerne zu Gesicht zu bekommen. Jedoch kann man manchmal auch an Objecten, die erst längere Zeit nach ihrem Tode in die Fixationsflüssigkeit übertragen sind, noch Kerntheilungsfiguren beobachten; dieselben sind aber nicht so zahlreich und weniger deutlich wie an frischen Präparaten.

Damit hängt es dann weiterhin zusammen, dass man der betreffenden Fixirungsflüssigkeit die Möglichkeit geben muss, rasch das ganze Präparat vollständig zu durchdringen, und es ergiebt sich daher als zweite Regel, dass die zu fixirenden Stückchen möglichst dünn genommen werden. Dieselben dürfen nicht dicker als 4 mm sein. Die Beobachtung dieser Regel ist um so nothwendiger, als die meisten Fixirungsflüssigkeiten an und für sich die Eigenschaft besitzen, ziemlich langsam in die Organstückchen einzudringen.

Weiterhin folgt aus dem Gesagten, dass man nur in den allerseltensten Fällen in der Lage ist, an Organtheilen von Leichen die Kerntheilungsfiguren darzustellen, weil man fast nie so frühzeitig, wie es nöthig wäre, seciren kann. Es beschränkt sich vielmehr für menschliche Organe die Untersuchung auf Theile, die dem menschlichen Körper durch Operation entnommen sind.

Es gelingt zwar auch an Stückchen, die in Alkohol oder Müller'scher Flüssigkeit gehärtet sind, wenn sie ganz frisch und in ganz dünnen Scheiben conservirt sind, die Kerntheilungsfiguren darzustellen, doch eignen sich erfahrungsgemäss eine Reihe von anderen Gemischen, von sog. Fixirungsmitteln, besser dazu.

Die angewandte Fixirungsflüssigkeit muss das Volumen der zu fixirenden Stückchen sehr erheblich übersteigen. Sie muss gewechselt werden, wenn sie sich irgendwie stärker trübt.

Unter den Fixirungsflüssigkeiten ist in erster Linie zu nennen:

**Flemming's Chromosmiumessigsäuregemisch.**

| | | | |
|---|---|---|---|
| Bereitung: | 2-proc. wässerige Osmiumsäurelösung | 4 | Theile |
| | 1-proc. wässerige Chromsäurelösung | 15 | „ |
| | Eisessig | 1 | „ |

Wenn man die Flemming'sche Lösung nicht zur Darstellung der Kerntheilungsfiguren, sondern zum Nachweis von Verfettungen benutzt, so ist es oft empfehlenswerth, eine geringere Menge Eisessig, 0,3—0,5 zuzusetzen, damit das Protoplasma nicht gar zu durchsichtig wird.

Anwendung:

1) Verweilen der Stückchen in der Fixationsflüssigkeit 1—3 Tage.
2) Auswaschen in Wasser 3—6 Stunden lang.
3) Nachhärtung successive, je einen Tag, in 30-, 60-, 96-proc. Alkohol.
4) In der Regel Celloidineinbettung. Danach

**Färbung mit Saffranin.**

1) ½—24 Stunden lang Färbung der Schnitte in 1-proc. wässeriger Saffraninlösung.
2) Ganz kurzes Abspülen in Wasser.
3) Auswaschen in absolutem Alkohol, der durch wenige Tropfen Salzsäurespiritus (1-proc.) ganz leicht angesäuert ist. Man giebt zu einer mittelgrossen Schale mit Alkohol 5—10 Tropfen Salzsäurespiritus (s. p. 36).
4) Auswaschen in reinem absolutem Alkohol, bis die Schnitte hellbraunroth aussehen.
5) Oel, Kanadabalsam.

Die Flemming'sche Methode mit nachfolgender Saffraninfärbung hat den Vortheil, dass die ruhenden Kerne nur ganz blass, die in der Theilung begriffenen Kerne dagegen sehr intensiv gefärbt werden. Dadurch ist es ermöglicht, schnell und schon bei schwacher Vergrösserung die in Theilung begriffenen Zellen mit annähernder Sicherheit zu erkennen und ein Urtheil über ihre Lage und über ihre ungefähre Zahl zu gewinnen. Bei manchen anderen Färbemitteln wird keine wesentliche Differenz in der Intensität der Färbung zwischen ruhenden Kernen und dem Kerngerüst der in Theilung begriffenen Zellen erzielt.

Babes empfiehlt zur Färbung **Anilinwassersaffranin.** Durch dasselbe wird die Färbung in kürzester Zeit bewirkt: 2 Theile Anilinöl werden mit 100 Theilen Wasser versetzt und Saffraninpulver im Ueberschuss zugefügt. Erwärmen auf 60°. Filtriren. Die Lösung hält sich 2 Monate lang. Will man aus irgend einem Grunde keine Saffraninfärbung anwenden, so kann man auch mit wässeriger Gentianaviolettlösung (s. p. 38) färben. Besonders gut eignet sich auch Carbolfuchsin zur Färbung. Eine sehr brauchbare, von Hermann angegebene Modification des Flemming'schen Säuregemisches besteht darin, dass man die Chromsäurelösung durch 1-proc. Platinchloridlösung ersetzt. Dadurch treten die Spindel, der Central- und Polkörper besonders scharf hervor.

Beabsichtigt man die in der Flemming'schen Lösung fixirten Schnitte in Hämatoxylin zu färben, so kann man sich der Benda'schen Methode bedienen, welche dem Weigert'schen Verfahren zur Färbung markhaltiger Nervenfasern nachgebildet ist.

**Benda's Hämatoxylinfärbung:**

1) Uebertragen der Schnitte in eine concentrirte Lösung von Cuprum aceticum, 24 Stunden lang bei Brütofentemperatur.
2) Gründliches Auswaschen.
3) Färben in 1-proc. wässeriger Hämatoxylinlösung, bis die Schnitte schwarz sind.
4) Entfärben in Salzsäure 1 : 500, bis die Schnitte gelb sind.
5) Neutralisiren der Säure in gesättigter Cuprum-aceticum-Lösung.

6) Auswaschen.
7) Alkohol — Oel — Kanadabalsam.

**Sublimat.**

Die Conservirung in der gesättigten, wässerigen Sublimatlösung (s. p. 11) gestattet ebenfalls den Nachweis der Kerntheilungsfiguren. Als Färbung empfiehlt sich die von Heidenhain-Biondi (s. p. 39), durch welche die ruhenden Kerne blauviolett, die in Theilung begriffenen grün gefärbt werden.

**Chromsäurelösungen.**

Dieselben werden in einer Stärke von 0,3—1,0 Proc. angewandt. Die Dauer der Einwirkung beträgt im Durchschnitt 24 Stunden bis mehrere Tage. Die Chromsäure dringt sehr schwer ein, die Stückchen müssen daher ganz besonders klein sein.

**Rabl's Chromameisensäure.**

Bereitung: Zu 200 ccm einer 0,3-proc. Chromsäurelösung werden 4—5 Tropfen concentrirter Ameisensäure gebracht.

Dauer der Einwirkung 12—24 Stunden. Gründliches Auswaschen. Successive Härtung in 30-proc., 60-proc., 96-proc. Alkohol.

**Fol'sche Fixirungsflüssigkeit.**

| | | |
|---|---|---|
| 1-proc. Osmiumsäure | 2 | Raumtheile |
| 1-proc. Chromsäure | 25 | „ |
| 2-proc. Essigsäure | 5 | „ |
| Wasser | 68 | „ |

**Chrompikrinsäure.**

| | | |
|---|---|---|
| Concentrirte wässerige Pikrinsäurelösung | 10 | Raumtheile |
| 1-proc. Chromsäure | 25 | „ |
| Wasser | 65 | „ |

**Altmann's Fixirung.**

1) Einlegen 1 Stunde lang in 3-proc. Salpetersäure.
2) Gründliches Auswaschen.
3) Nachhärten in Alkohol.

**Alkohol.** Auch durch absoluten Alkohol allein kann man, wenn man ihn auf ganz dünne Stückchen einwirken lässt, eine Fixirung erreichen. Heisser Alkohol fixirt bedeutend schneller und leichter. Die Färbung kann dann nach der Vorschrift von Bizzozero-Vassale bewirkt werden.

1) Färbung 10 Minuten lang in **Ehrlich'scher Gentianaviolettlösung:**

| | |
|---|---|
| = Gentianaviolett | 1,0 |
| Alkohol | 15,0 |
| Anilinöl | 3,0 |
| Wasser | 80,0. |

2) Schnelles Auswaschen in absolutem Alkohol.
3) Uebertragen in Jodjodkalilösung 1 : 2 : 200, 2 Minuten lang.
4) 30 Secunden in absoluten Alkohol.
5) 30—40 Secunden in Chromsäure 0,1 : 100.
6) Alkohol absolut. 20—30 Secunden.
7) Chromsäure 0,1 : 100, 30 Secunden lang.
8) Alkohol absolut. 30 Secunden lang.
9) Nelkenöl. Dasselbe wird so oft gewechselt, bis keine Farbe mehr abgeht.

Die Umständlichkeit und der kostspielige Verbrauch von Nelkenöl sind Nachtheile dieser Methode.

**Baumgarten's Methode.** Die Methode von Baumgarten zur Darstellung der Kerntheilungsfiguren verdient besondere Erwähnung, weil dieselbe combinirt mit einer Färbung auf Bakterien angewandt werden kann.

1) Härtung mehrere Wochen lang in dünnen Chromsäurelösungen.
2) Färben 5—10 Minuten lang in concentrirter alkoholischer Fuchsinlösung.
3) Kurzes Abspülen in Alkohol absolutus.
4) Färben 5—10 Minuten lang in wässeriger Methylenblaulösung.

Die Anwendung des Methylenblau nach der vorherigen Färbung mit Fuchsin hat den Zweck, dies letztere aus der Zwischensubstanz zu verdrängen, und so eine intensivere Färbung der Kerne resp. der Kerntheilungsfiguren zu bewirken.

Will man gleichzeitig auf Bacillen, speciell auf Tuberkelbacillen untersuchen, so färbt man vorher 24 Stunden lang in Anilinwassermethylviolett und entfärbt mit verdünnter Säure, resp. schliesst bei anderen Bakterien mit Hinweglassung der Säure direct das Fuchsinmethylenblauverfahren an.

**Gram'sche Methode.** Auch die Gram'sche Bakterienfärbung (s. p. 60 u. p. 63) gestattet die Darstellung der Kerntheilungsfiguren. An Präparaten, die, natürlich in entsprechend dünnen Scheiben, in Alkohol gehärtet waren, werden die ruhenden Kerne durch die Gram'sche Methode entfärbt (oft nur theilweise), während die in Theilung begriffenen die Farbe behalten.

## Darstellung von Zelleinschlüssen.

Darstellung der Zellgranula nach Altmann.

1) Conservirung der dem eben getödteten Thiere entnommenen Organstückchen, 24 Stunden lang, in einer Mischung von
   5-proc. Lösung von doppeltchromsaurem Kali
   2-proc. Lösung von Ueberosmiumsäure
   zu gleichen Theilen.
2) Mehrstündiges Auswaschen in fliessendem Wasser.
3) Härtung in 75-proc., dann 90-proc., dann absolutem Alkohol.
4) Durchtränkung mit Xylol und Paraffineinbettung (cf. p. 19).
5) Schneiden.
6) Entfernung des Paraffins aus den auf dem Objectträger aufgeklebten Schnitten mit Xylol; dann Abspülen mit Alkohol.
7) Auftropfen einer 20-proc. Lösung von Säurefuchsin in kaltgesättigtem Anilinwasser und Erwärmen über der Flamme, bis die Lösung dampft.
8) Abkühlen lassen und Abspülen des Farbstoffs mit einer Mischung von
   concentr. alkoholischer Pikrinlösung 1 Theil, Wasser 2 Theile.
9) Aufgiessen einer zweiten Menge von Pikrinlösung und vorsichtiges Erwärmen derselben 30—60 Sekunden lang auf dem Paraffinofen.
10) Abspülen mit Alkohol, dann Xylol.
11) Xylol, Kanadabalsam.

Russel hat zur Darstellung von Zelleinschlüssen, speziell in Geschwülsten, folgendes Verfahren angegeben:

1) Härtung in Alkohol oder Müller'scher Flüssigkeit.
2) Färbung, 10 Minuten lang oder länger, in einer gesättigten Lösung von Fuchsin in 2-proc. Carbolwasser.
3) Auswaschen in Wasser, einige Minuten lang.
4) Auswaschen in absolutem Alkohol, $^1/_2$ Minute lang.
5) Färben, 5 Minuten lang, in 1-proc. Lösung von Jodgrün in 2-proc. Carbolwasser.
6) Schnelles Entwässern in absolutem Alkohol, Nelkenöl, Kanadabalsam.

---

## Neuntes Capitel.

## Untersuchung degenerativer Veränderungen.

### A) Die Nekrose.

Nekrotische Herde lassen sich, falls sie mit blossem Auge erkennbar und ihre Bestandtheile isolirbar sind, meist mit Vortheil frisch untersuchen; man streicht mit dem Messer über den nekrotischen Herd und vertheilt die an der Messerklinge haftende nekrotische Masse in Wasser oder in Kochsalzlösung, oder man zerzupft kleine herausgeschnittene Stückchen in denselben Flüssigkeiten. Es ist dieses Verfahren z. B. anwendbar bei nekrotischen Herden in Gehirn, Leber, Herz, Muskeln und Lunge.

Nekrosen einzelner Zellen oder kleiner Zellcomplexe müssen an Schnitten untersucht werden. Es eignet sich sowohl Härtung in Alkohol wie in Müller'scher Flüssigkeit. Immer ist es rathsam, die Präparate in Celloidin einzubetten, weil sonst Theile des nekrotischen Herdes leicht ausfallen können. Zur Färbung dienen die gebräuchlichen Kernfärbemittel: Hämatoxylin, Alaunkarmin, Lithionkarmin. Da in den nekrotischen Herden die Zellen und ihre Kerne zu Grunde gegangen sind, so werden sie durch Kernfärbemittel nicht mehr gefärbt und heben sich daher von ihrer stärker gefärbten Umgebung durch ihre blasse Farbe ab. Es kommt aber auch manchmal in den nekrotischen Herden zu einer diffussen, nicht differenzirten Färbung. Ausserdem bemerkt man oft innerhalb der Nekrosen unregelmässig gestaltete und ungleich grosse Körner, die den Farbstoff ganz intensiv aufnehmen und zum Theil als Reste von zerfallenen Kernen aufzufassen sind.

Durch Karmin oder Eosin lassen sich nekrotische Massen diffus färben. Zur Unterscheidung von einer einfachen Gerinnung resp. Fibrinbildung dient die Weigert'sche Fibrinfärbung (s. p. 95), die bei Nekrosen negativ ausfällt.

### B) Einfache Atrophie und Pigmentatrophie.

Leicht isolirbare Gewebsbestandtheile können an Zerzupfungspräparaten untersucht werden, z. B. Nerven und Muskeln; eventuell kann man sie, um die Isolirung der Theile zu erleichtern, 24 Stunden lang in $^1/_3$ Alkohol oder eine andere Isolationsflüssigkeit (s. p. 6) bringen. Durch Zusatz von Essigsäure wird das Bild noch deutlicher. Einen besseren Einblick erhält man durch Untersuchung gefärbter Schnitte von gehärteten Präparaten. Zur Färbung empfiehlt sich, wenn es sich

um Pigmentatrophie handelt, Lithionkarmin (s. p. 36), weil sich gegen dessen Farbe das Pigment besser abhebt als gegen Hämatoxylin.

### C) Trübe Schwellung.

Die Untersuchung wird am besten frisch an isolirten Zellen vorgenommen, welche durch Abschaben mit der Messerklinge oder durch Zerzupfen aus ihrem Zusammenhang herausgelöst und in Wasser vertheilt worden sind. Zum Unterschiede von der Verfettung verschwinden die bei der trüben Schwellung innerhalb der Zellen sichtbaren Körner bei Essigsäurezusatz, während sie andererseits durch Fettlösungsmittel: Alkohol absol., Aether, Cloroform etc. nicht angegriffen werden.

### D) Fettige Degeneration.

Die Untersuchung wird ebenfalls am besten an frischen Präparaten vorgenommen, entweder an isolirten Zellen oder an frischen Schnitten. Die Fettkörnchen, welche sich innerhalb der Zellen finden, zeigen gegenüber von Reagentien folgende mikrochemischen Eigenschaften:

1) Sie verschwinden auf Essigsäurezusatz nicht.
2) Sie sind resistent gegen dünne Kali- und Natronlauge (s. p. 8).
3) Auf Zusatz von 1-proc. Osmiumsäure werden sie schwarz gefärbt.
4) Sie lösen sich auf Zusatz von Cloroform und Aether.

Will man diese letztere Reaction anwenden, so muss man das Präparat zuerst durch absoluten Alkohol entwässern, dann eine Zeit lang Chloroform oder Aether einwirken lassen, diese wiederum durch Alkohol entfernen und schliesslich in Kochsalzlösung untersuchen.

Zur Härtung ist der Alkohol nicht geeignet, weil er das Fett nach und nach auflöst. Bei Härtung in Müller'scher Flüssigkeit bleiben die Fetttröpfchen zwar erhalten, sie fliessen aber theilweise zu grösseren Tropfen zusammen. Dagegen erhält man sehr gute Resultate mit der Marchi'schen Härtungsmethode (s. p. 107).

Sehr empfehlenswerth ist ferner die Härtung in Flemming'scher Lösung (s. p. 43), 4 Tage lang, danach sorgfältiges, bis 24 Stunden langes Auswässern, Nachhärtung je einen Tag in 30-proc., 60-proc., 96-proc., Alkohol und eventuell Celloidineinbettung. Wenn die Stücke nicht sehr sorgfältig ausgewaschen werden, so bilden sich schwarze Niederschläge; zur Vermeidung solcher empfiehlt ausserdem Flemming noch, die Osmirung in einem dunklen Raume vorzunehmen. Die Präparate werden auf dem Gefriermikrotom geschnitten und können mit Saffranin (s. p. 44) gefärbt werden. Manchmal ist nebenbei zum Vergleich eine einfache Färbung mit Eosin von Nutzen.

Nach der Färbung kurzes Entwässern in absolutem Alkohol, Aufhellen in Oel und Einschluss in Kanadabalsam. Das zur Aufhellung benutzte Oel muss aus den Schnitten sehr sorgfältig entfernt werden. Terpentinöl ist möglichst zu vermeiden, auch längeres Verweilen in Xylol (z. B. bei der Paraffineinbettung), da beide Stoffe, ebenso wie Aether und Creosot, das osmirte Fett lösen. Dasselbe wird nicht gelöst in Alkohol, Chloroform und Nelkenöl. Zum Einschluss wählt man harten, über der Flamme flüssig gemachten Kanadabalsam, der schnell wieder erhärtet. In dem gewöhnlichen, dünnflüssigen Xylolkanadabalsam diffundiren die Fetttröpfchen zum Theil.

Bei allen Präparaten, bei denen zur Fixirung und Schwarzfärbung des Fettes stärkere Osmiumsäurelösungen angewandt sind, müssen die

Stücke, nachdem man sie aus der Osmiumsäure herausgenommen hat und bevor man sie in Alkohol überträgt, sehr gründlich ausgewaschen werden. Im anderen Falle zieht, wie das namentlich Heidenhain hervorgehoben hat, der Alkohol aus dem Gewebe überschüssige Osmiumsäure und wahrscheinlich auch reducirende Substanzen aus, so dass die Flüssigkeit mehr oder weniger schwarz erscheint, weil sich Osmiumsäure in feinsten Partikelchen ausscheidet. Was aber im Alkohol ausserhalb des Präparates und um dasselbe geschieht, das kann sich, wie Heidenhain betont, auch in demjenigen Theil des Alkohols ereignen, der das Präparat durchtränkt. Das schwarze Metall bildet dann einen Beschlag auf den Geweben auch da, wo von einem Fettgehalt nicht die Rede sein kann. Derartige Trugbilder werden aber vermieden, wenn man die überschüssige Osmiumsäure durch Auswaschen in reichlichen Mengen von Wasser vor dem Einlegen in Alkohol entfernt.

### E) Schleimige Entartung.

Schleimig entartete Gewebe werden am besten frisch untersucht. Da nicht nur Essigsäure, sondern auch Alkohol Gerinnung bewirkt, so ist zur Härtung Müller'sche Flüssigkeit zu wählen.

Zum Nachweis des Mucins empfiehlt Hoyer Härtung resp. Fixirung in Sublimat und nachherige Paraffineinbettung; doch lässt sich die Färbung auch an Celloidinpräparaten erzielen.

Das Mucin färbt sich gut mit allen basischen Anilinfarben, ganz besonders mit Methylenblau (in wässeriger Lösung).

Mit dem als Amethyst bezeichneten Thionin der Firma Joh. Rud. Geigy u. Comp., Basel[1]), sowie mit Toluidinblau (2 Tropfen einer gesättigten wässerigen Lösung auf 5 ccm Wasser) erhält man eine Doppelfärbung, indem das Mucin blauroth bis rothviolett, die übrigen Bestandtheile des Gewebes aber hellblau werden.

Eine gute Färbung des Mucins erhält man auch mit der van Gieson'schen Methode (p. 41).

### F) Colloidentartung.

Gewebe mit theilweiser colloider Entartung können in Alkohol oder Müller'scher Flüssigkeit gehärtet werden. Zur Färbung eignet sich sowohl Hämatoxylin wie namentlich Doppelfärbung mit Hämatoxylin und Eosin.

Durch die van Gieson'sche Färbung (s. p. 41) wird das Colloid gelbroth, oft auch leuchtend roth gefärbt, so dass es in Schnitten sich auf das deutlichste von den übrigen Gewebsbestandtheilen abhebt.

Die Farbenreaction allein genügt aber nicht zur Unterscheidung von Hyalin, da Colloid manchmal ebenso leuchtend roth gefärbt wird wie Hyalin.

### G) Amyloidentartung.

Amyloid entartete Gewebe können an frischen Schnitten, die sich wegen der festen Consistenz leicht anfertigen lassen, oder nach vorhergegangener Härtung in Alkohol oder Müller'scher Flüssigkeit untersucht werden.

Zur Erkennung der amyloiden Degeneration dienen die nachfolgenden Reactionen:

---

[1]) Thionin ist jetzt auch von deutschen Firmen zu beziehen.

a) Jodreaction.

Man bringt die Schnitte in eine cognakbraune Jodlösung, die man sich durch Verdünnen der gewöhnlichen Lugol'schen Lösung (s. p. 8) mit destillirtem Wasser herstellt. Nach 3 Minuten wäscht man in Wasser aus und untersucht in Glyzerin. Die amyloid degenerirten Partien erscheinen dann braunroth, während das übrige Gewebe eine hellgelbe Farbe angenommen hat.

Die braunrothe Farbe wird noch glänzender, wenn man zu der Jodlösung 25 Proc. Glyzerin zusetzt. Die Farbenreaction ist vergänglich. Schnitte können aber als Dauerpräparate aufgehoben werden, wenn man das von Langhans für Glycogenpräparate empfohlene Verfahren (s. p. 52) anwendet.

b) Jod-Schwefelsäurereaction.

Legt man einen, in der eben angegebenen Weise mit Jod behandelten Schnitt in 1-proc. Schwefelsäure, so wird die braune Farbe der amyloid degenerirten Theile entweder eine gesättigtere, oder sie geht in eine violette, blaue, bis grüne Färbung über. Manchmal treten einzelne dieser Farbennuancen schon bei blosser Jodbehandlung auf.

Reactionen mit Jod, die der Amyloidreaction ähnlich sind, geben

1) Die Corpora amylacea, die sich hauptsächlich in der Prostata und im Centralnervensystem finden. Sie färben sich mit Jodjodkalilösung braun, während das übrige Gewebe gelb bleibt.
2) Amylumkörner färben sich mit sehr verdünnter Lugol'scher Jodlösung (1 : 4—5) blau.
3) Cellulose in Pflanzentheilen färbt sich in einfacher Jodlösung gelb. Lässt man nun aber nach kurzem Abspülen in Wasser vom Rande des Deckgläschen her reine Schwefelsäure zufliessen, so färbt sich Cellulose da, wo die Schwefelsäure frisch zur Einwirkung kommt, kornblumenblau.

c) Methylviolettreaction.

1) Färben in einer 1-proc. Methylviolettlösung, 3—5 Minuten.
2) Auswaschen in destillirtem Wasser, dem 1 Proc. Salzsäure zugesetzt ist.
3) Untersuchung in Glyzerin.

Die Amyloidsubstanz ist purpurroth, das übrige Gewebe blau gefärbt. Die Färbung hält sich in Glyzerin eine Zeit lang, so dass man die Schnitte nach Umrandung mit Wachs und Ueberziehen mit Maskenlack auch als Dauerpräparate aufheben kann. Eine fast gleiche Reaction giebt Gentianaviolett. Auch mit der sog. Leonhardi'schen Tinte, die Methylviolett enthält, kann man die Reaction erzielen.

Entwässerung der Schnitte in Alkohol und Einlegen in Kanadabalsam ist unzulässig. Dagegen hält sich die Farbe verhältnissmässig lange, wenn man in einer gesättigten Lösung von Kali aceticum conservirt. Ebenso ist zur Einbettung Lävulose (Weigert) oder statt derselben auch der billigre Zuckersyrup empfohlen worden.

d) Methylgrün.

Wendet man Methylgrün in derselben Weise an wie Methylviolett sub c, so färben sich die amyloiden Partieen violett, das übrige Gewebe, namentlich die Kerne, grün.

e) Jodgrün.

1) 24 Stunden langes Färben frischer oder gehärteter Schnitte in einer Lösung von

Jodgrün 0,5
Aqu. dest. 150.

2) Einfaches Abwaschen in Wasser.

Die amyloiden Massen werden rothviolett, die übrigen Gewebe bleiben grün. Stilling rühmt dieser Reaction gegenüber dem Methylviolett eine grössere Sicherheit nach.

f) Methode von Birch-Hirschfeld.

1) Färben in einer 2-proc. spirituösen Bismarckbraunlösung (s. p. 38), 5 Minuten lang.
2) Abspülen in absolutem Alkohol.
3) Auswaschen in destillirtem Wasser, 10 Minuten lang.
4) Färben in 2-proc. Gentianaviolettlösung, 5—10 Minuten.
5) Auswaschen in angesäuertem Wasser: 10 Tropfen Essigsäure auf ein Uhrschälchen mit Wasser.
6) Einschluss in Lävulose.

Diese Methode gewährt eine sehr scharfe Abgrenzung der amyloid degenerirten Partien gegenüber dem anderen Gewebe, dessen Kerne braun gefärbt sind.

g) Doppelfärbung mit Hämatoxylin und Eosin.

Diese ist niemals zu unterlassen, wenn man das Verhalten der amyloiden Substanz zu den einzelnen Gewebsbestandtheilen untersuchen will. Man erhält sehr klare Bilder, an denen man sich oft besser orientiren kann als an den einer specifischen Amyloidreaction unterworfenen Schnitten. Die amyloide Substanz färbt sich rosa, die Kerne der atrophischen Zellen sind auch in unmittelbarer Nähe der Amyloidschollen gut zu erkennen, während sie bei den Amyloidreactionen hier oft verdeckt werden.

h) van Gieson'sche Färbung.

ist ganz besonders geeignet, um die Beziehungen der Amyloidsubstanz, welche rosa bis braunroth gefärbt wird, zu den übrigen Geweben darzustellen.

## H) Hyaline Degeneration.

Zur Untersuchung derselben bedient man sich der Doppelfärbung mit Hämatoxylin und Eosin. Aber auch bei einfach gefärbten Schnitten tritt schon die homogene, glasige Beschaffenheit des hyalin entarteten Bindegewebes meist hinreichend deutlich hervor.

Ganz besonders gut eignet sich zum Nachweis des Hyalins die van Gieson'sche Methode, welche demselben eine leuchtend rothe Farbe verleiht.

## I) Nachweis von Glykogen.

Die Stücke, z. B. Nieren von Diabetikern oder Geschwulsttheile, müssen möglichst frisch in Alkohol gehärtet sein; da Wasser das Glykogen auszieht, so ist Müller'sche Flüssigkeit nicht zu verwenden. Legt man die Schnitte in eine schwache Jodlösung, so färbt sich das Glykogen weinroth. Da sich aber auch bei der Jodlösung, der Einfluss des Wassers unangenehm bemerklich macht, so benutzt man nach

Ehrlich zur Färbung eine dicke Gummilösung, der 1 Proc. Lugol'sche Lösung zugesetzt ist, und bewahrt die Schnitte auch in dieser Lösung auf.

Ebenso kann man die Schnitte in Glyzerin untersuchen, dem die Hälfte seines Volumens Lugol'sche Lösung beigemischt ist. Diese Untersuchungsmethode hat den Vortheil, dass die Schnitte zugleich stark aufgehellt werden.

Nach Langhans eignet sich zur Aufhellung und zur Conservirung Origanumöl ganz besonders gut. Man darf aber die vor dem Einlegen in Origanumöl nöthige Entwässerung der Schnitte nicht in reinem absolutem Alkohol vornehmen, der das Jod sofort auszieht, sondern in einer Mischung von 4 Theilen absoluten Alkohols, und 1 Theil officineller Jodtinctur. Das Verfahren ist demnach folgendes:

1) Härtung, möglichst frisch in absolutem Alkohol.
2) Färben in Lugol'scher Lösung.
3) Entwässern in einer Mischung von Jodtinctur 1 Theil, Alkohol absolut. 4 Theile.
4) Aufhellen und Conserviren in Origanumöl.

Lubarsch giebt an, dass sich Glykogin auch nach der Weigert'schen Fibrinfärbungsmethode gut darstellen lässt, man darf aber die Jodlösung nur ganz kurze Zeit einwirken lassen.

## K) Imprägnation mit Kalksalzen.

Die Kalksalze bilden im Gewebe bei frischer Ablagerung glänzende Körner, welche durch 5-proc. Salzsäure aufgelöst werden, die man vom Rande des Deckglases her dem Schnitt zufliessen lässt. Die vorher undurchsichtigen Partien werden in Folge der Lösung des Kalkes durchsichtig, und zwar löst sich der kohlensaure Kalk unter Bildung von Luftblasen, der phosphorsaure ohne solche. Bei beginnender Verkalkung färbt sich das Gewebe mit Hämatoxylin oft intensiv blau; ebenso verkalkt gewesenes und durch Säure entkalktes Gewebe, z. B. verkalkte Knorpelgrundsubstanz an der endochondralen Ossificationsgrenze.

## L) Pigmentbildung.

In hämorrhagischen Herden befindet sich einmal Hämatoidin, sowohl amorph wie in Form von rhombischen Täfelchen. Dasselbe ist an seiner orangegelben oder mehr rothen Farbe leicht zu erkennen. Daneben kommen aber amorphe gelbe bis schwarzbraune Schollen vor, die man ihres Eisengehaltes wegen unter dem Namen „Hämosiderine" zusammenfasst.

Die Hämosiderine resp. ihr Eisengehalt wird nachgewiesen:

a) durch Ferrocyankaliumlösung und Salzsäure.

Man bringt die Schnitte für einige Minuten in eine 2-proc. wässerige Ferrocyankaliumlösung und von da in Glyzerin, dem $^1/_2$-proc. Salzsäure zugesetzt ist. Die Hämosiderine nehmen dann eine deutlich blaue Farbe an.

Will man Dauerpräparate herstellen mit gleichzeitiger Kernfärbung, so verfährt man in folgender Weise. Man setzt der gewöhnlichen Lithionkarminlösung (s. p. 36) einige Tropfen Ferrocyankaliumlösung zu und behandelt entweder in salzsäurehaltigem Glycerin nach, oder man wäscht in Salzsäurespiritus (s. p. 36) aus, überträgt in Wasser, entwässert in Alkohol und schliesst in Kanadabalsam ein.

Besonders zu empfehlen ist, sowohl was die Kernfärbung wie die Ausdehnung der Eisenreaction betrifft, das Verfahren von H. Stieda:

1) Vorfärbung, mehrere Stunden lang, in Lithionkarminlösung.
2) Kurzes Abspülen in destillirtem Wasser.
3) Uebertragen für 4—6 Stunden lang in 2-proc. Ferrocyankaliumlösung.
4) Uebertragen in 1-proc. Salzsäurespiritus für 6—12 Stunden.
5) Kurzes Abspülen in Wasser, Spiritus, Alkohol abs., Hopfenöl, Kanadabalsam.

Man kann übrigens auch zuerst die Eisenreaction mit Ferrocyankalium und Salzsäureglycerin anstellen, dann die Schnitte auswaschen und mit Alaunkarmin nachfärben.

b) Nachweis durch Schwefelammonium.

1) Einlegen der Schnitte in frisch bereitete Schwefelammoniumlösung, 5—20 Minuten lang, bis sie eine dunkelgrüne oder schwarzgrüne Farbe angenommen haben.
2) Rasches Abspülen in Wasser.
3) Untersuchung und Conservirung in Glyzerin, welches schwach schwefelammoniumhaltig ist.

Das Eisen tritt dann in Gestalt von kleinen schwarzen oder schwarzgrünen Körnchen hervor.

Man kann die Präparate auch aus dem Wasser in Alkohol, Nelkenöl, Kanadabalsam bringen.

In neuerer Zeit hat Zalewski einige Modificationen der Ferrocyankalium- und Schwefelammoniumreaction angegeben. Zunächst empfiehlt er, die Reactionen nicht an einzelnen Schnitten, sondern an kleinen Stückchen, entsprechend der Methode der Durchfärbung, anzustellen.

Die Ausführung ist dann folgende:

a) Schwefelammonium.

1) Conservirung der Stückchen, 24 Stunden lang, in 65-proc. Alkohol.
2) Härtung, 24 Stunden lang in 96-proc. Spiritus, dem einige Tropfen starkes, gelbes Schwefelammonium zugesetzt sind; von Zeit zu Zeit umzuschütteln!
3) Härtung in absolutem Alkohol, der mit einigen Tropfen Schwefelammonium versetzt ist.
4) Schneiden etc.

Der Alkohol soll das Gefäss bis zum Rand füllen, um den oxydirenden Einfluss der Luft auszuschliessen. Korkpfropfen dürfen zum Verschluss nicht angewandt werden, weil sie schon an und für sich mit Schwefelammonium eine Eisenreaction geben. In schwefelammoniumhaltigem Alkohol können die Stücke lange Zeit aufbewahrt werden.

b) Gelbes Blutlaugensalz.

1) Conservirung der Stückchen, 24 Stunden lang, in 65-proc. Alkohol.
2) Uebertragung in 1-proc. [1]) Lösung von gelbem Blutlaugensalz in 96-proc. Spiritus, 2—3 Tage lang.
3) Uebertragung in 1-proc. Lösung von gelbem Blutlaugensalz in 65-proc. Spiritus.

---

[1]) Ich habe eine so starke Lösung in 96-proc. Spiritus nicht erzielen können.

4) Uebertragung in 1—2-proc. Salzsäurespiritus. (Spiriuts = 96-proc.), 2—3 Tage lang.
5) Schneiden etc. Nachträgliche Karminfärbung gelingt sehr gut.

Die Behandlung mit 65-proc. Spiritus (unter 3) wird eingeschoben, um das spätere Eindringen der Salzsäure zu erleichtern. Die mit gelbem Blutlaugensalz behandelten Stücke eignen sich besser zur nachträglichen Färbung als die mit Schwefelammonium behandelten.

In analoger Weise, wie gelbes Blutlaugensalz, kann man für Eisenoxydulverbindungen auch rothes Blutlaugensalz (Blaufärbung) und für Eisenoxydverbindungen auch Rhodankalium (Blutrothfärbung) anwenden, jedesmal mit nachfolgender Salzsäurebehandlung.

Wenn man auf Eisen untersuchen will, darf man natürlich keine Stahlnadeln anwenden und muss überhaupt den Contact mit eisenhaltigen Gegenständen sorgfältig vermeiden.

Quincke hat als Nachtheil der Ferrocyankaliummethode angegeben, dass sie das Eiweis stark coagulirt und leicht in die Umgebung diffundirt. Dieser letztere Umstand ist von geringerer Bedeutung, wenn man die Entstehung der Reaction in salzsäurehaltigem Glyzerin direct unter dem Mikroskop verfolgt.

Andererseits darf nicht unbeachtet bleiben, dass Schwefelammonium ähnliche Niederschläge, wie mit Eisen, noch mit einer ganzen Reihe von anderen Metallen macht, von denen ein praktisches Interesse im vorliegenden Falle namentlich salpetersaures Silber, Blei und Quecksilber haben dürften.

Manchmal mag es deshalb von Vortheil sein, beide Reactionen neben einander in Anwendung zu ziehen.

Zu bemerken ist ferner, dass nicht alle Pigmente, auch wenn sie zweifellos Eisenverbindungen darstellen, die genannten Reactionen geben. Einmal kann die Verbindung des eisenhaltigen Pigments mit dem Gewebe eine derartige sein, dass eine Reaction ausbleibt; und dann scheinen auch die Pigmente nur in einem gewissen Stadium die Eisenreaction zu geben. Bei ganz frischen Pigmenten und ebenso bei ganz alten tritt sie nicht ein.

Will man einfach die Lage des Pigments studiren, so eignen sich für die Schnittfärbung am meisten rothe Farbstoffe (Lithionkarmin, Boraxkarmin, Alaunkarmin), weil sich diesen gegenüber das Pigment besser abhebt. Alaunkarmin ist mehr zu empfehlen als Lithionkarmin, weil bei ersterem kein Auswaschen in Salzsäure nöthig ist.

Darstellung der Häminkrystalle s. p. 126.

---

## Zehntes Capitel.

## Untersuchung wuchernder und entzündeter Gewebe.

Zur frischen Untersuchung von Geschwülsten zum Zweck der Diagnose wendet man das Zerzupfungsverfahren an, wenn es sich um Tumoren mit viel Bindegewebe handelt. Bei zellreichen Geschwülsten, namentlich Sarkomen und Carcinomen, kann man durch blosses Ueberstreichen mit dem Messer Material gewinnen, um die Form, Grösse und Art der Zellen festzustellen.

Eine sehr schnelle Diagnose am Schnittpräparate ermöglicht die

Härtung in Formalin mit nachfolgendem Schneiden auf dem Gefriermikrotom.

Wuchernde und entzündete Gewebe werden in Flemming'scher Lösung, in Müller'scher Flüssigkeit oder in Alkohol gehärtet.

Vor allem ist die Müller'sche Flüssigkeit anzuwenden, wenn es darauf ankommt, entweder Schrumpfungen der Gewebe möglichst zu vermeiden oder das Blut in den Gefässen zu erhalten. Zarte, zellreiche Gewebe, weiche Sarkome, myxomatöse Geschwülste, Gliome, Enchondrome etc. färben sich nach Härtung in Müller'scher Flüssigkeit weit schöner als bei Alkoholhärtung. Auch die Zenker'sche Flüssigkeit (s. p. 11) ist empfehlenswerth.

Will man dagegen wuchernde Gewebe zugleich auf die Gegenwart von Bakterien untersuchen, so ist Härtung in Alkohol vorzuziehen.

Wenn man genauere Untersuchungen über die in wuchernden Geweben, z. B. in Geschwülsten, enthaltenen Zell- und Kernstructuren anstellen will, so kann man einmal eine möglichst frische Untersuchung der Zellen in indifferenten Lösungen, etwa 0,6-proc. Kochsalzlösung, vornehmen. Von Arnold wird eine ganz schwache Lösung von Methylgrün in 0,6-proc. Kochsalzlösung als sehr geeignet zur Untersuchung von Zellen und von deren Kernen empfohlen. Ganz besonders kommen aber auch hier in Betracht Präparate, die nach den für Darstellung der Kerntheilungsfiguren (s. p. 43) empfohlenen Methoden behandelt sind. Am besten eignet sich dazu die Flemming'sche Lösung. Die Untersuchung von Kerntheilungsfiguren ist ferner ganz unerlässlich, wenn man entscheiden will, von welchen Zellarten bei entzündlicher Neubildung, bei Hyperplasien, bei Tumoren etc. die Wucherung resp. die Gewebsneubildung ausgeht. Bei Tumoren wählt man zu derartigen Untersuchungen Theile, die der Grenze zwischen Geschwulst und präexistirendem Gewebe entnommen sind.

Die Schnitte sind in erster Linie mit kernfärbenden Mitteln zu behandeln. Dabei ist zu bemerken, dass sich gewöhnlich die verschiedenen Zellarten in verschiedener Intensität färben. Am dunkelsten werden namentlich durch Hämatoxylin die Leukocyten tingirt, so dass man schon in der Farbenreaction ein wichtiges Hülfsmittel hat, um die ausgewanderten, weissen Blutzellen resp. entzündlichen Infiltrate von den präexistirenden Gewebszellen, auch wenn sie im Uebrigen ähnliche Form besitzen, zu unterscheiden.

In chronisch entzündeten Geweben, und zwar vorwiegend im Bindegewebe, finden sich oft in grosser Zahl die sog. Mastzellen. Dieselben sind 2–3 Mal so gross, wie Leukocyten, haben einen blassen Kern und ein grobkörniges Protoplasma, dessen einzelne Körner sich mit basischen Anilinfarben, also mit denselben Färbemitteln, mit denen auch die Bakterien tingirt werden, färben. Der Kern selbst bleibt dabei meist ungefärbt.

Zur Darstellung der Mastzellen verfährt man nach Ehrlich in folgender Weise:

1) Alkoholhärtung.
2) 12—24 Stunden färben in:
   Dahlia, im Ueberschuss
   Alkohol absolut. 50 ccm
   Aqu. destillat. 100 „
   Eisessig 12,5 „
3) Auswaschen in Wasser.

Will man in einem entzündeten Gewebe ausser den Mastzellen auch die Zellkerne färben, so wendet man nach Ehrlich-Westphal folgendes Verfahren an:

1) Färbung 24 Stunden lang in:

| | |
|---|---|
| Dahlia, conc. alkoholische Lösung<br>Alaunkarmin<br>Glyzerin | ana 100,0 |
| Eisessig | 20,0 |

2) Auswaschen in Alkohol.
3) Oel, Kanadabalsam.

Die Kerne im Gewebe sind roth gefärbt, die Granulationen der Mastzellen und die Bakterien blau.

Der Entzündungsprocess am lebenden Gewebe wird gewöhnlich am Mesenterium des Frosches studirt.

Man wählt zur Untersuchung grosse, männliche Thiere, weil bei Weibchen sich die Sexualorgane bei dem Herausziehen des Mesenteriums oft störend in den Weg legen. Man bläst dem Thiere mit einer Glaspipette 2 Tropfen 1-proc. wässeriger Curarelösung unter die Haut, die man, am besten am Oberschenkel, mit einer feinen Hohlscheere an einer kleinen Stelle spaltet. Nach etwa $^1/_2$—$^3/_4$ Stunde ist dann das Thier bewegungslos. Nun spaltet man in der Axillarlinie die Bauchwand, und zwar zunächst die Haut, dann die Musculatur und eröffnet schliesslich etwa in der Ausdehnung eines Centimeters mittels eines von oben nach unten verlaufenden Schnitts die Bauchhöhle. Sowie bei den einzelnen Phasen des Schnitts eine Blutung auftritt, sucht man diese, bevor man weiter nach der Tiefe vordringt, zu stillen, was gewöhnlich durch Aufdrücken von Fliesspapier gelingt.

Dann zieht man eine Darmschlinge sammt ihrem Mesenterium vor und spannt diese letztere über einen Korkring, den man mit dem Locheisen aus einer Korkplatte ausgeschnitten und mittels Siegellack auf einer Glasplatte befestigt hat. Das Mesenterium wird mit Karlsbader Nadeln fixirt, welche man durch den Darm auf dem Kork festheftet. Natürlich muss die Curarisirung eine vollständige sein, weil sich sonst das Thier loszerrt.

Als Unterlage eignen sich namentlich die Glasplatten, wie sie zu Plattenculturen im Gebrauch sind. Man befestigt dann den Kork an einer Längsseite, so dass das Thier neben dem Kork auf der Platte ausgiebigen Platz findet. Das Thier wird mit Ausnahme derjenigen Stelle über dem Korkring, welche man unter das Mikroskop bringt, ganz mit Fliesspapier bedeckt, welches mit Wasser durchtränkt ist.

Man kann dann meist schon nach $^1/_4$ Stunde den Beginn der Auswanderung der weissen Blutkörperchen beobachten und die Beobachtung Stunden lang fortsetzen, wenn nur das Thier ganz mit feuchtem Fliesspapier bedeckt ist. Will man die Untersuchung über einen Tag hinaus ausdehnen, so muss man von Neuem curarisiren.

In ähnlicher Weise kann auch die Schwimmhaut und die Zunge des Frosches zur Beobachtung der Circulation benutzt werden.

## Elftes Kapitel.

## Untersuchung von Bakterien.

### A) Bakterien in Flüssigkeiten.

Bakterien in Flüssigkeiten kann man nach folgenden Methoden untersuchen:

1) Untersuchung der ungefärbten Bakterien auf dem Objectträger.

Man bringt von der zu untersuchenden Flüssigkeit einen Tropfen auf den Objectträger, entweder unverdünnt oder, wenn die Flüssigkeit sehr reich an zelligen Bestandtheilen ist, mit etwas destillirtem Wasser verdünnt, und deckt mit einem Deckglas zu.

Man untersucht dann mit starker Vergrösserung und enger Blendung. Man kann sich die Untersuchung erleichtern, und sich, namentlich wenn es sich um Kokken handelt, vor einer Verwechslung mit Eiweisskörnchen schützen, wenn man zu dem Präparat verdünnte Essigsäure oder 2-proc. Kalilauge bringt, gegen welche die Bakterien sich — mit Ausnahme der Recurrensspirillen — resistent verhalten. Ebenso werden Bakterien durch Alkohol, Chloroform und Aether nicht verändert, während Fetttröpfchen verschwinden.

In den meisten Fällen sichert übrigens schon die ganz gleichmässige Form und Grösse der Bakterien, oft auch ihre eigenthümliche Lagerung in Ketten-, Trauben- oder Zoogloeaform vor Irrthümern.

Will man Bakterien aus einer Cultur frisch untersuchen, so bringt man mit einer ausgeglühten Platinöse etwas von der Cultur in einem Tropfen Wasser auf den Objectträger und verreibt es auf diesem. Statt des destillirten Wassers kann man auch 0,6-proc. Kochsalzlösung oder Bouillon verwenden. Die Eigenbewegung der Bakterien sistirt man, wenn sie für die Untersuchung störend wird, dadurch, dass man vom Rande des Deckgläschens aus einen Tropfen Sublimatlösung zufliessen lässt.

2) Die Untersuchung im hängenden Tropfen.

Dieselbe ist viel bedeutsamer, weil sie auch die Lebensbedingungen der Bakterien fortgesetzt zu beobachten gestattet.

Man bedient sich dazu der hohlgeschliffenen Objectträger, welche in der Mitte eine uhrschalenförmige Vertiefung besitzen. Diese Vertiefung wird rings an ihrem Rande mit einer ganz dünnen Schicht Vaseline bestrichen, damit die kleine feuchte Kammer, welche gebildet wird, wenn man auf diese Vertiefung das Deckglas auflegt, luftdicht abgeschlossen werden kann. Nun bringt man auf die Mitte des vorher sorgfältig gereinigten Deckglases vermittels der Platinöse einen feinen Tropfen der zu untersuchenden Flüssigkeit und legt dann das Deckglas so auf die Vaselinschicht, dass der Tropfen nach unten in den Hohlraum des Objectträgers frei herunterhängt. Objectträger und Deckglas, sowie alle sonstigen zur Verwendung kommenden Instrumente müssen durch Ausglühen gut sterilisirt sein.

Auch im hängenden Tropfen untersucht man mit enger Blendung. Vor allem muss man sich hüten, bei der nicht ganz leichten groben Einstellung des Tubus das Deckgläschen einzudrücken. Hat man die Untersuchung im hängenden Tropfen beendigt, so kann man das Deckglas abheben, etwa anhaftende Vaseline mit Benzin entfernen und dann,

nachdem der etwas ausgestrichene Tropfen angetrocknet ist, noch nachträglich färben.

Will man die biologischen Eigenschaften bestimmter Bakterien, die man z. B. in einer Reinkultur gezüchtet hat, studiren, so bringt man auf das Deckgläschen einen Tropfen sterilisirter Bouillon und impft dann den Bouillontropfen mittels einer ausgeglühten Platinnadel von der betreffenden Reincultur. In dieser Weise kann man die Untersuchung im hängenden Tropfen Tage lang fortsetzen und auch zwischendurch das Präparat im Brütofen verweilen lassen.

3) Nachweis der Bakterien durch das Färbungsverfahren.

Für die Färbung der Bakterien kommen fast ausschliesslich die basischen Anilinfarben in Betracht, und zwar sind am meisten in Gebrauch: Gentianaviolett, Methylenblau, Methylviolett, Fuchsin und Bismarckbraun (Vesuvin). Diese Farben kommen meistens in wässeriger Lösung zur Anwendung. Da nun diese wässerigen Lösungen nicht sehr haltbar sind, so hält man sich von den genannten Farbstoffen am besten concentrirte alkoholische Lösungen vorräthig, von denen man sich dann vor dem jedesmaligen Gebrauch durch Einträufeln in destillirtes Wasser eine frische wässerige Lösung bereitet, die einen Farbstoffgehalt von etwa 1—1½ Proc. haben soll. Die Wirkung und Färbekraft der Anilinfarben wird verstärkt:

a) Durch Erwärmung, entweder längere Zeit bei Brütofentemperatur, oder für kurze Zeit über einer Spirituslampe, bis von der Oberfläche der Flüssigkeitsschicht Dämpfe aufzusteigen beginnen.

b) Durch einen Zusatz von Kalilauge. Dieser bediente sich Koch, zusammen mit dem Einfluss der Wärme bei der ursprünglichen Tuberkelbacillenfärbung.

Jetzt kommt die Kalilauge vorwiegend noch in der Löffler'schen Methylenblaulösung zur Verwendung, welche wegen ihrer vielfachen Gebrauchsfähigkeit und ihrer Haltbarkeit eine Art von Universalfärbemittel für Bakterien darstellt.

c) Durch Lösen der Farbe in Anilinwasser. Zur Bereitung des Anilinwassers giesst man 5 Theile Anilinöl zu 100 Theilen Wasser und schüttelt ordentlich um. Die beim Schütteln entstehende milchige Flüssigkeit filtrirt man. Sie muss dann klar und vollkommen durchsichtig abfliessen. In dem Anilinwasser wird dann entweder direct die Farbe gelöst, oder man giesst von einer concentrirten alkoholischen Lösung so viel zu, bis eine deutliche Opalescenz eintritt.

Man verwendet hauptsächlich Anilinwasserfuchsin und Anilinwassergentianaviolett.

d) Ebenso wie Anilinwasser verstärkt auch 5-proc. Carbolwasser die Wirkung der Anilinfarben. Die Carbolwasserlösungen der Anilinfarben sind ganz besonders zu empfehlen wegen ihrer ausgezeichneten Färbefähigkeit und wegen ihrer Haltbarkeit.

Die Entfernung der überschüssigen Farbe geschieht bei weitem in den meisten Fällen durch einfaches Auswaschen in reichlichen Mengen von destillirtem Wasser.

Ausserdem kommen in Betracht:

a) Alkohol,

b) verdünnte Essigsäure, meist ½—1-proc.

Beide bewirken eine vollständigere Entfernung der Farbe und bei Schnitten ein besseres Hervortreten der Kernfärbung. Zu letzterem

Zweck wendet man auch manchmal zuerst Essigsäure und dann noch Alkohol an.

c) Jodjodkalilösung 1 : 2 : 100.

d) Mineralsäuren 3—10-proc.

Diese beiden letzteren Mittel entfärben sehr stark, auch einen Theil der Spaltpilze, so dass dadurch andere Bakterienarten, welche die Fähigkeit haben, die Farbe länger festzuhalten, besser hervortreten.

e) Verschiedene Salze, welche die Kerne entfärben: kohlensaures Kali und Natron, Liquor ferri sesquichlorat., Kali bichrom., Kalium hypermanganic., Palladiumchlorid, kohlensaures Lithion etc.

f) Auch durch sauere Anilinfarben: Tropaeolin und Fluorescin, die man dem zur Entfärbung verwendeten Alkohol zusetzt, wird eine stärkere Entfärbung bewirkt als durch Alkohol allein.

In den meisten Fällen färben die aufgezählten basischen Anilinfarben alle ziemlich gleich gut. Eine besondere Verbreitung hat namentlich gefunden:

**Löffler's Methylenblaulösung.**

Concentrirte alkoholische Methylenblaulösung 30 ccm
Kalilauge 0,01 : 100 100 „

Sie hat, wie alle Methylenblaulösungen, vor den übrigen Anilinfarben den Vorzug grosser Haltbarkeit.

## Färbung von Deckglastrockenpräparaten.

Will man nun eine Flüssigkeit mittels des Färbeverfahrens auf Bakterien untersuchen, so streicht man eine dünne Lage derselben auf dem Deckgläschen mittels der Platinöse aus, oder man bedeckt das mit einem Tropfen der Flüssigkeit versehene Deckglas mit einem zweiten und zieht dann beide von einander ab. Dann lässt man das Deckglas, mit der bestrichenen Seite nach oben, lufttrocken werden und zieht es dreimal langsam durch eine Spiritusflamme. Es ist aber zu bemerken, dass man diese Fixation durch das Erwärmen nicht eher vornehmen darf, als bis das Präparat vollkommen lufttrocken geworden ist. Nun bringt man das Deckgläschen entweder so in ein Uhrschälchen mit Farblösung, dass man das zwischen Daumen und Zeigefinger gefasste Gläschen auf die Farbflüssigkeit herabfallen lässt, auf welcher es dann mit der bestrichenen Seite nach unten schwimmt, oder man trägt vermittels eines Glasstabes oder einer Pipette einfach ein paar Tropfen der Farblösung auf das Deckglas auf. Nach 1—2—3 Minuten wäscht man in Wasser ab, indem man das Deckglas in einer Schale mit Wasser hin und herbewegt, bis es keine Farbe mehr abgiebt, oder indem man auf die gefärbte Seite den Strahl einer Spritzflasche wirken lässt; dann trocknet man das Deckglas sehr sorgfältig zwischen mehrmals gewechselten Lagen von Fliesspapier ab; man kann auch das vollständige Trockenwerden des Präparats noch dadurch sichern, dass man dasselbe mehrmals über der Flamme hin und her zieht. Wenn das Präparat noch irgend Spuren von Feuchtigkeit enthält, so wird der Kanadabalsam trübe.

Dann bringt man das Deckglas mit einem Tropfen Kanadabalsam auf den Objectträger. Will man das Präparat nicht conserviren, so kann man auch das Deckglas einfach mit einem Tropfen Wasser auf den Objectträger bringen. Die Kanadabalsampräparate geben aber viel bessere Bilder.

Will man eine isolirte Färbung der Bakterien, ohne Färbung der Kerne etc., erzielen, so bringt man das Deckgläschen aus der Farbe zunächst eine Minute lang in eine gesättigte Lösung von kohlensaurem Kali, die zur Hälfte mit Wasser verdünnt ist. Dann erst folgt Auswaschen in Wasser etc.

Es ist demnach die Reihenfolge der Manipulationen bei der Deckglasfärbung die folgende:

1) Ausbreiten der Flüssigkeit auf dem Deckglas und Trockenwerdenlassen.
2) Dreimaliges Durchziehen durch die Flamme.
3) Färben, 1—3 Minuten lang.
4) Abspülen in Wasser.
5) Trocknen zwischen Fliesspapier.
6) Kanadabalsam.

In der beschriebenen Weise kann man mit wässerigen Lösungen von Fuchsin, Gentianaviolet, Methylenblau und Bismarckbraun färben. Namentlich Gentianaviolett eignet sich sehr gut zu den meisten derartigen Färbungen, bei denen man natürlich auch von den oben aufgeführten Unterstützungsmitteln der Färbung Gebrauch machen kann. Auch die Löffler'sche Methylenblaulösung ist sehr zu empfehlen; dann leisten auch die Farblösungen in Carbolwasser sehr gute Dienste. Für manche Fälle aber eignet sich mehr das

Gram'sche Färbungsverfahren.

1) Färbung 2—5 Minuten lang in gesättigter Anilinwassergentianaviolettlösung.
2) Uebertragen des Präparats 1—1½ Minuten in Jodjodkalilösung 1 : 2 : 300, in welcher dasselbe ganz schwarz wird.
3) Entfärben in Alkohol, bis die anfangs schwarze Farbe verschwunden und das Präparat blassgrau geworden ist.
4) Einlegen in Kanadabalsam.

Die Entfärbung in absolutem Alkohol kann nach Günther beschleunigt und verstärkt werden, wenn man demselben 3 Proc. Salpetersäure zusetzt. Dieses Verfahren hat ausser der schnelleren und gründlicheren Entfärbung auch den Vortheil, dass dabei Niederschläge von Farbstoff mehr vermieden werden. Die Präparate kommen dann aus der Jodjodkalilösung zunächst in reinen absoluten Alkohol, dann für 10 Secunden in Salpetersäurealkohol, und dann wieder in reinen Alkohol. Nach Ribbert kann man auch zur schnelleren und stärkeren Entfärbung dem Alkohol 10—20 Theile Essigsäure zusetzen.

Auch durch Anwendung von Methylviolett statt des Gentianaviolett der ursprünglichen Vorschrift werden Niederschlänge vermieden und die Bakterien erhalten einen leuchtend blauen Farbenton. Die Gram'sche Färbungsmethode hat zwei grosse Vortheile. Einmal wird alles, was in den Präparaten noch an zelligen Bestandtheilen vorhanden ist, entfärbt, so dass die Bakterien mit tiefblauer Farbe um so deutlicher und schärfer hervortreten. Eine Ausnahme machen nur: die Kernteilungsfiguren, die Mastzellenkörner, die Hornschicht der Epidermis und die serösen Ueberzüge der Organe. Die Zellen können übrigens durch eine nachträgliche Contrastfärbung mit Bismarckbraun wieder sichtbar gemacht werden.

Der zweite grosse Vorzug des Gram'schen Verfahrens besteht darin, dass durch dasselbe nur gewisse Bakterienarten gefärbt bleiben, während andere die sonst manchmal den gefärbt bleibenden morphologisch sehr

ähnlich sind, entfärbt werden. Es kann also unter Umständen das Gram'sche Verfahren zu differentiell-diagnostischen Zwecken verwandt werden und kommt dann eventuell noch neben der gewöhnlichen Bakterienfärbung zur Anwendung.

Nach Gram färben sich: Tuberkelbacillus, Leprabacillus, Tetanubacillus, Pneumoniecoccus von Fränkel-Weichselbaum, Streptococcus pyogenes, Streptococcus des Erysipels, Staphylococcus pyogenes aureus, albus, citreus und flavus, Milzbrandbacillen, Bacillen des Schweinerothlaufs, der Mäuseseptikämie, Diphtheriebacillus und Micrococcus tetragenus.

Nach Gram werden entfärbt: Typhusbacillen, Gonokokken, Friedländer'sche Kapselbacillen, Koch'scher Kommabacillus der Cholera, Rotzbacillus, Bacillus des malignen Oedems, Rauschbrandbacillus, Hühnercholera, Kaninchenseptikämie, Schweineseuche, Rinder- und Wildseuche, Recurrensspirillen.

## Darstellung der Geisseln und Wimperhaare der Bakterien.

Die von Löffler angegebene Methode beruht auf der Anwendung einer Beize, welche in folgender Weise hergestellt wird.

1) Zu 10 ccm einer wässerigen Tanninlösung (20 : 80) werden so viel Tropfen kaltgesättigter, wässeriger Ferrosulphatlösung zugesetzt, bis die Flüssigkeit schwarz-violett erscheint; dann wird 1 ccm wässeriger oder alkoholischer Lösung von Fuchsin zugesetzt (weniger wirksam wie Fuchsin sind Methylviolett, oder Campecheholzdecoct = 1 : 8). Mit dieser Beize wird das Deckglastrockenpräparat unter Erwärmen über der Flamme behandelt, bis Dampfentwickelung eintritt, dann wird das Deckglas noch 1 oder $1^1/_2$ Minuten mit der Beize im Contact gelassen.

Enthält die bakterienhaltige Flüssigkeit Schleim, oder Eiweiss, oder Gelatine, so müssen diese Substanzen durch mehrfach wiederholte Uebertragung in Wasser möglichst entfernt werden.

Vor Anwendung der Beize müssen die Deckglaspräparate in der gewöhnlichen Weise durch die Flamme gezogen werden; zu starkes Erhitzen vernichtet aber die Beizbarkeit.

Für manche Bakterien (Säurebildner) wirkt besser ein Zusatz von Alkali (einige Tropfen einer 1-proc. NaOH-Lösung), für andere (Alkalibildner) besser ein Säurezusatz ($H_2SO_4$). Der Grad des Säure- oder Alkalizusatzes muss dann ausprobirt werden.

2) Abspülen in Wasser, dann in absolutem Alkohol.

3) Nachfärben in einer gesättigten Anilinwasser-Fuchsinlösung welche durch tropfenweisen Zusatz einer 1-proc. NaOH-Lösung neutralisirt ist. Es wird so lange NaOH-Lösung zugesetzt, bis die an und für sich in einer mehrere Centimeter dicken Schicht noch durchsichtige Flüssigkeit anfängt, undurchsichtig zu werden. Diese Farbflüssigkeit wird auf das Deckglas aufgetropft und letzteres etwa 1 Minute lang erwärmt, bis Dampfbildung auftritt.

## B. Färbung von Schnittpräparaten.

Die Untersuchung von Bakterien in Schnitten geschieht fast immer nach vorausgegangener Färbung.

Zur Bakterienfärbung werden die Schnittpräparate immer direct aus dem absoluten Alkohol in die Farblösung gebracht. Für die meisten Fälle eignet sich sehr gut Gentianaviolett.

Im Allgemeinen kommen dieselben Methoden der Färbung in Be-

tracht, wie für die Deckglastrockenpräparate. Dabei sind jedoch gewisse Modificationen von Vortheil.

1) Meist ist es zweckmässig, die Schnitte länger in der Farbe zu belassen als Trockenpräparate derselben Bakterien.

2) Sehr oft ist es von Nutzen, die Färbung in der Wärme vorzunehmen, entweder im Brütofen oder über einer Spiritusflamme. Die Erwärmung über der Spiritusflamme darf nur so weit getrieben werden, bis von der Oberfläche der Farblösung Dämpfe aufzusteigen beginnen.

3) Es erleichtert bei solchen Schnitten, bei denen durch den Entfärbungsprocess die Kerne entfärbt oder undeutlich werden, die Untersuchung oft sehr, wenn man durch eine Doppelfärbung die Kerne wieder sichtbar macht. Für solche Doppelfärbungen eignet sich namentlich Lithionkarmin, Pikrokarmin und Bismarckbraun.

4) Will man die theilweise Entfärbung der Schnitte, welche das Entwässern in Alkohol mit sich bringt, vermeiden oder verringern, so kann man dem zum Entwässern benutzten Alkohol etwas von derselben Farbe zusetzen, in der man gefärbt hat. Der Alkohol wirkt dann nur noch wasserentziehend, entzieht aber dem Präparat keine Farbe mehr. In der Regel aber ist dieses Verfahren überflüssig, wenn man von vornherein so stark färbt, dass eine partielle Entfärbung in Alkohol nicht nur nicht schadet, sondern erwünscht ist.

5) Zur Aufhellung der Schnitte eignet sich Nelkenöl nicht, da es die Anilinfarben auszieht, zum Theil ihnen auch einen schmutzigen Farbenton verleiht. Besser ist Origanumöl; am meisten aber empfiehlt sich zum Aufhellen von Bakterienschnitten Xylol (s. p. 29).

Die einzelnen Methoden, die bei der Färbung von Schnitten auf Bakterien zur Verwendung kommen, sind die folgenden:

Färbung nach Löffler.

1) Färbung in Löffler's Methylenblau (s. p. 59) 3—5 Minuten lang.
2) 10—30 Secunden lang in 0,5 proc. bis 1,0-proc. Essigsäure.
3) Entwässern in Alkohol; Xylol, Kanadabalsam.

Man kann auch der Essigsäure zur stärkeren Entfärbung so viel Tropaeolin zusetzen, dass sie eine hellgelbe Farbe erhält.

Färbung in Gentianaviolett.

1) Färbung in 2-proc. wässeriger oder in ebenso starker alkoholischer Gentianaviolettlösung, bis die Schnitte dunkelviolett geworden sind.
2) Auswaschen in absolutem Alkohol, bis eine hellviolette Färbung erzielt ist.
3) Xylol, Kanadabalsam.

Diese Methode giebt bei vielen Schnitten, namentlich z. B. bei Milzbrandbacillen, ausgezeichnete Resultate. Es wird eine ganz distincte hellviolette Färbung der Kerne erzielt, von denen sich die Bacillen durch ihre gesättigtere Färbung scharf abheben.

In einzelnen Fällen ist es praktisch, die Schnitte aus der Farbe und vor dem Auswaschen in Alkohol für 10—20 Secunden in 5-proc. Essigsäure zu bringen.

Fuchsinfärbung nach Pfeiffer.

1) Alkoholhärtung.
2) Färben $^1/_2$ Stunde lang oder länger in Carbolfuchsinlösung (p. 80) 1:20 Aqu. destillat.

3) Auswaschen in einer Schale destillirten Wassers, dem 1 Tropfen Eisessig zugesetzt ist, bis der Schnitt grauviolett aussieht.
4) Alkohol, Oel, Kanadabalsam.

Gram'sche Färbung.

S. p. 60. Die Färbung wird etwas länger vorgenommen wie bei Trockenpräparaten. In die Jodlösung werden die Schnitte entweder direct aus der Farblösung, oder nachdem man sie für ganz kurze Zeit in 0,6-proc. Kochsalzlösung gebracht hat, mit dem Spatel übertragen, weil sie sich sonst stark kräuseln.

Meist ist dann noch eine Nachfärbung am Platze, die am besten mit Bismarckbraun in folgender Weise bewirkt wird.

1) Der in Alkohol entfärbte Schnitt wird 2—5 Minuten in wässeriger oder alkoholischer Bismarckbraunlösung (s. p. 38) gefärbt.
2) Auswaschen in Alkohol absolut., bis der Schnitt gelbbraun geworden ist.
3) Xylol, Kanadabalsam.

Auch vor der Bakterienfärbung kann schon eine Kernfärbung mit Pikrokarmin (p. 37) oder besser noch Lithionkarmin (p. 36) vorgenommen werden. Dieses Verfahren verdient im Allgemeinen den Vorzug, da manche Bakterien durch die nachfolgende Färbung mit Bismarckbraun undeutlicher werden.

Verfahren von Weigert.

1) Härtung der Präparate in absolutem Alkohol.
2) Färben in einer gesättigten Anilinwassergentianaviolettlösung oder Methylviolettlösung 5—15 Minuten lang.
3) Kurzes Abspülen in 0,6-proc. Kochsalzlösung.
4) Der Schnitt wird auf dem Spatel oder auf dem Objectträger aus der Kochsalzlösung genommen und vorsichtig mit Fliesspapier abgetrocknet.
5) 1—2 Minuten in Jodjodkalilösung auf dem Spatel oder Objectträger.
6) Abtrocknen mit Fliesspapier.
7) Entfärben in Anilinöl, bis dasselbe keine Farbe mehr annimmt.
8) Entfärben des Anilinöls mit Xylol.
9) Kanadabalsam.

Die Methode giebt sehr gute Bilder. Es färben sich nur die Spaltpilze (und etwa vorhandenes Fibrin) tiefblau. Will man auch das Gewebe sichtbar machen, so färbt man vorher 3 Minuten lang in Lithionkarmin (s. p. 36) und bringt die Schnitte aus dem Wasser, in welchem der salzsaure Spiritus entfernt wurde, in die Anilinwassergentianaviolettlösung. Die Färbung mit Lithionkarmin muss vorher geschehen, weil bei der Weigert'schen Färbung eine Entwässerung in Alkohol unzulässig ist.

Methylenblaumethode von Kühne.

1) Uebertragen der Schnitte aus dem Alkohol in eine Lösung von

| | |
|---|---|
| Methylenblau | 1,5 |
| Alkohol absolut. | 10,0 |
| 5-proc. Carbolwasser | 100,0 |

½—2 Stunden lang (letzteres bei Leprabacillen).
2) Schnelles Abspülen in Wasser.
3) Auswaschen in angesäuertem Wasser, 2 Tropfen Salzsäure : 100 Wasser, bis die Schnitte blassblau geworden sind.

4) Abspülen in einer Lösung von kohlensaurem Lithion. 6—8 Tropfen concentrirte Lösung von kohlensaurem Lithion auf 10 ccm Wasser.
5) Uebertragen in reines Wasser, 3—5 Minuten lang.
6) Kurzes Verweilen in absolutem Alkohol.
7) Uebertragen in Methylenblau-Anilinöl (1 Messerspitze voll auf 10,0 Anilinöl gelöst; von dieser Lösung vor dem Gebrauch zu reinem Anilinöl so viel zugesetzt, bis der gewünschte Farbenton erzielt ist).
8) Reines Anilinöl.
9) Uebertragen in ätherisches Oel, z. B. Tereben.
10) Xylol.
11) Kanadabalsam.

(Anm. Tereben wird durch Mischung und wiederholte Destillation von Terpentinöl mit Schwefelsäure erhalten.)

Die etwas umständliche Methylenblaumethode von Kühne ist auf verhältnissmässig viele Bakterienarten anwendbar; auch schwieriger zu färbende Bacillen treten durch sie deutlich hervor. Will man neben der Bakterienfärbung auch noch eine scharfe Kernfärbung erzielen, so wäscht man nicht in angesäuertem Wasser, sondern statt dessen in stark verdünnter wässeriger Lösung von Chlorhydrinblau aus.

Trockenmethode von Unna.

Manche Bakterien werden bei der Entwässerung des Schnittes in Alkohol ganz oder theilweise entfärbt. Diesem Nachtheil begegnet die Trockenmethode von Unna:

Der Schnitt kommt aus der Entfärbungsflüssigkeit in Wasser und wird dann auf dem Objectträger ausgebreitet. Nun wird das Wasser durch mehrmaliges Aufdrücken von Fliesspapier möglichst entfernt, und dann der Objectträger über der Flamme schnell bis zum vollständigen Austrocknen des Schnittes erhitzt. Nach dem Erkalten erfolgt sofort Einschluss in Kanadabalsam.

### Schnittpräparate von Gelatineculturen.

In den letzten Jahren sind mehrere Methoden empfohlen worden, um Schnittpräparate von Gelatinestichculturen anzufertigen.

Zu dem Zwecke sticht man die Agar- oder Gelatinecultur aus oder entfernt sie durch leichtes Erwärmen des Reagensglases. Man kann auch das letztere zerschlagen. Der Gelatine- oder Agarstich wird dann in 85-proc. — 95-proc. Spiritus übertragen, gehärtet, später auf Kork fixirt und mit dem Mikrotom geschnitten.

Neisser empfiehlt, die Stiche zunächst je nach der Grösse für 1—8 Tage in eine 1-proc. Lösung von doppeltchromsaurem Kali zu übertragen und der Einwirkung des Lichtes auszusetzen. Dann gründliches Auswaschen in Wasser und Härtung erst in 70-proc., dann in 95-proc. Alkohol.

Die Färbung geschieht in den gewöhnlichen Lösungen von Anilinfarben. Gelatine und Agar selbst geben sowohl in Alkohol wie in Anilinöl den Farbstoff ab. Aehnlich wie bei Stichculturen verfährt man auch bei Plattenculturen.

Nach Hauser kann man Bakterienculturen in folgender Weise durch Formalin conserviren.

Man benetzt den Wattepfropfen der Stichcultur oder das Fliesspapier der Schale bei Plattenculturen mit einigen Tropfen Formalin und

bringt das Ganze dann in ein verschliessbares Gefäss, in welchem man in einem Schälchen einen Wattebausch, der mit 10—15 Tropfen Formalin befeuchtet ist, aufstellt.

Auf diese Weise erhält die Gelatine die Consistenz von in 70-procentigem Alkohol gehärtetem Celloidin und kann bei keiner Temperatur mehr verflüssigt werden.

Namentlich verflüssigende Bakterien können so in den verschiedenen Stadien der Verflüssigung eine Zeit lang zu Demonstrationszwecken conservirt werden.

Auch kann man einzelne Culturen auf der Platte ausstechen, herausheben, auf dem Objectträger mit gewöhnlicher Gelatine umgiessen, unter einem Deckglas für 24 Stunden in die Formalinkammer bringen und dann mit einem Lackring umschliessen. Ebenso lassen sich direct auf dem Objectträger angelegte Culturen fixiren, und eventuell auch in ganz dünner Fuchsinlösung differenziren.

## Färbung der Sporen.

Die Sporen bilden helle, stark glänzende Körner entweder innerhalb der Bacillen oder an einem Ende des Stäbchens. Sie sind dadurch ausgezeichnet, dass sie den Farbstoff viel schwerer aufnehmen als Bakterien und demgemäss bei den gewöhnlichen Bakterienfärbungen als ungefärbte, helle Körnchen erscheinen. Sie geben aber auch den einmal aufgenommenen Farbstoff viel schwerer wieder ab, als die Bakterien selbst. Darauf beruht die Methode der Sporenfärbung.

Man färbt dieselben längere Zeit in der Wärme mit Anilinwasserfuchsin oder Carbolfuchsin und entfärbt dann kurze Zeit in einer Mineralsäure, die den Bakterienleib wieder entfärbt, während die Spore gefärbt bleibt. Wäscht man dann in Wasser aus und wendet nachträglich für die schon entfärbten Bakterien eine Contrastfärbung, am besten Methylenblau an, so erscheinen die Sporen, die von der nachträglichen Methylenblaufärbung unbeeinflusst bleiben, roth, die Bakterien dagegen blau. Die Färbung der Sporen ist mit Sicherheit bis jetzt nur in Deckglaspräparaten gelungen.

Das Verfahren stellt sich also folgendermaassen dar:

1) Aufstreichen der zu untersuchenden Flüssigkeit auf Deckgläser, Lufttrocknen und dreimaliges Durchziehen durch die Flamme.
2) Färbung 20—40 Minuten lang in erwärmter Anilinwasserfuchsinlösung oder in Carbolfuchsin.
3) 1 Minute lang Entfärben in 5-proc. Salpetersäure.
4) Abspülen in Wasser.
5) Färben, 2 Minuten lang in Löffler'schem Methylenblau.
6) Abspülen in Wasser.
7) Trocknen zwischen Fliesspapier.
8) Kanadabalsam.

### Sporenfärbung von Möller.

1) Fixiren des lufttrocknen Deckglaspräparates durch dreimaliges Durchziehen durch die Flamme oder 2 Minuten langes Eintauchen in absoluten Alkohol.
2) Eintauchen in Chloroform, 2 Minuten lang.
3) Abspülen mit Wasser.
4) Eintauchen in 5-proc. Chromsäurelösung, $^1/_2$—2 Minuten lang.
5) Gründliches Abspülen in Wasser.

6) Auftropfen von Carbolfuchsin, Erwärmen über der Flamme, unter einmaligem Aufkochen, 1 Minute lang.
7) Abgiessen des Carbolfuchsin, Entfärbung in 5-proc. Schwefelsäure.
8) Gründliches Auswaschen in Wasser.
9) Färbung, 30 Secunden lang, in wässeriger Lösung von Methylenblau oder Malachitgrün.
10) Abspülen, Trocknen, Kanadabalsam.

Auch die Methode von Löffler zur Darstellung von Geisselfäden der Bakterien ist geeignet zur Sporenfärbung.

Eine isolirte Färbung der Sporen kann man auch erzielen, wenn man die Deckglaspräparate durch öfteres Durchziehen durch die Flamme (10—30mal) oder durch Einbringen in den Sterilisationsschrank bei 200° erhitzt und dann in einer wässerigen Lösung, am besten Methylenblau, färbt. Die Kerne und Bakterien verlieren durch das Erhitzen ihre Färbbarkeit, während umgekehrt die Sporen leichter färbbar werden.

## Culturverfahren der Bakterien.

In sehr vielen Fällen führt das einfache Färbungsverfahren der Bakterien, sei es im Deckglastrockenpräparat oder im Schnitt, nicht zum Ziel und es bedarf zur genauen bakteriologischen Diagnose des Culturverfahrens. Es sind bei demselben dreierlei Prozeduren zu unterscheiden. I. Die Sterilisation. II. Die Bereitung der Nährböden. III. Die Anlegung der Culturen selbst.

### I. Sterilisation.

Zur Sterilisation von Instrumenten kann man sich vielfach des Ausglühens in der Flamme eines Bunsenbrenners bedienen. Auf diese Weise werden z. B. die Platinösen, die Kartoffelmesser etc. sterilisirt. Auch die bei dem Plattenculturverfahren in Anwendung kommenden Platten werden, nachdem sie vorher schon eine Sterilisation im Trockensterilisirungsschrank erfahren haben, kurz vor dem Gebrauch noch über einer Bunsenflamme abgeglüht. Reagenzgläser, Glasplatten etc. werden im Trockensterilisirungsschrank, d. h. einem Schrank aus Eisenblech, der auf 150—170° erhitzt werden kann, $^1/_2$—1 Stunde lang erhitzt.

Nährlösungen dürfen so hohen Temperaturgraden nicht ausgesetzt werden. Ihre Sterilisation wird daher in strömendem Wasserdampf vorgenommen. Hierzu bedient man sich am besten des Koch-schen Dampfkochtopfes, d. h. eines mit Asbest umhüllten Kessels, der durch einen durchlöcherten Einsatz in zwei Theile getheilt ist. In der unteren wird das Wasser erhitzt und in Dampf übergeführt, die obere Hälfte nimmt die zu sterilisirenden Gegenstände auf. Zur Sterilisation genügt ein Aufenthalt von einer Stunde.

In manchen Fällen zieht man dann auch einen Autoclaven oder Papin'schen Topf zur Anwendung von gespanntem Dampf in Gebrauch.

Gegenstände, die nicht unmittelbar mit Bakterienkeimen in Berührung kommen, so. z. B. feuchte Kammern, werden auch mit 1 ‰ Sublimatlösung sterilisirt.

## II. Bereitung der Nährböden.

Man unterscheidet flüssige und feste Nährböden, und unter den letzteren wieder solche, die nur bei gewöhnlicher Temperatur anwendbar sind (Gelatine) und solche, die auch Brüttemperatur ausgesetzt werden können (Agar, Kartoffel, Blutserum).

**Nährbouillon** wird in der Weise zubereitet, dass man 500 g Rindfleisch möglichst von Sehnen und Fett befreit, hackt und dann 24 Stunden lang bei kühler Temperatur mit der doppelten Quantität Wasser stehen lässt. Dann presst man das Fleisch aus, filtrirt, und setzt 10 g Pepton und 5 g Kochsalz zu. Dann wird $^1/_2$—1 Stunde lang gekocht, die Flüssigkeit durch Zusatz von Natronlauge alkalisch gemacht und die warme Lösung filtrirt. Schliesslich wird die Bouillon in Kölbchen oder Reagenzgläschen gefüllt und im Dampfkochtopf 1 Stunde lang sterilisirt.

**Gelatine** wird so hergestellt, dass man zu der Bouillon noch 10 Proc. Gelatine hinzusetzt und in der Wärme löst. Dann wird eine Natronlauge neutralisirt, $^1/_2$ Stunde lang gekocht, und nun nochmals die Reaction geprüft und wenn nothwendig alkalisirt.

Die Abfüllung in einzelne, vorher im Trockenschrank sterilisirte Reagenzgläser geschieht, um ein Erstarren der Gelatine zu verhindern, durch einen Glastrichter, der in einem Heisswassertrichter von Kupfer steht und der ein doppeltes Filter enthält. Der Glastrichter ist unten mit einem Hahn oder auch mit einem Gummischlauch und Quetschhahn versehen.

Dann wird drei Tage lang jeden Tag $^1/_4$ Stunde lang im Dampfkochtopf sterilisirt, da die Gelatine vielfach ein einmaliges längeres Erhitzen nicht mehr verträgt. Sowohl bei Bouillon wie bei Gelatine kann man eine etwa auftretende Trübung dadurch beseitigen, dass man das Weisse von einem Ei mit der doppelten Menge Wasser verrührt und der Nährlösung bei einer Temperatur von 40—50° zusetzt. Beim späteren Kochen gerinnt dann das Eiweiss und fällt etwaige Trübungen.

**Agar.** Zu der Bouillon werden 1,5 Proc. Agar-Agar zugesetzt. Dann wird die Mischung einige Stunden lang gekocht, bis das Agar sich gelöst hat, alkalisirt, von Neuem 1 Stunde lang gekocht und in derselben Weise wie Gelatine durch doppeltes Filter in erwärmte Glastrichter abgefüllt. Die vorher im Trockenschrank sterilisirten Reagenzgläser werden nach der Füllung mit Agar von Neuem 3 Tage lang je $^1/_2$ Stunde in strömendem Dampf sterilisirt. Vielfach ist es zweckmässig, die Lösung in schräger Richtung erstarren zu lassen. Zur Klärung kann man auch hier Hühnereiweiss (s. oben) zusetzen.

In vielen Fällen empfiehlt es sich, noch Glyzerin (4—6—8 Proc.) manchmal auch Traubenzucker (2 Proc.) zuzusetzen. Glyzerin eignet sich namentlich für Tuberkelbacillen, aber auch für viele andere pathogene Bakterien. Zucker und ameisensaures Natron (0,5 Proc.) sind besonders bei der Züchtung von Anaeroben von Werth.

Auch ein Zusatz von Blut oder von Hämoglobin ist unter Umständen von Nutzen.

Blut entnimmt man unter allen Cautelen der sorgfältig gereinigten Fingerbeere des Menschen oder dem Thiere und streicht den Tropfen mit einer ausgeglühten Platinöse über die Agaroberfläche. Dann bringt

man die Röhrchen auf einen Tag in den Brütschrank, um etwaige Verunreinigungen noch vor dem Gebrauch zu entdecken.

Hämoglobin gewinnt man am besten aus Taubenblut, indem man dasselbe mit der 3—4fachen Menge sterilisirter 0,6proc. Kochsalzlösung schüttelt und dann im Eisschrank sedimentiren lässt. Das Sediment von rothen Blutkörperchen wird noch zwei Mal mit Kochsalzlösung gewaschen und dann durch Schütteln mit einer geringen Menge Aether das Hämoglobin gelöst. Der Aether wird im Vacuum verdampft und die zurückbleibende Hämoglobinlösung durch ein Kieselgurfilter filtrirt. Ein Tröpfchen von ihr wird in 0,6 proc. Kochsalzlösung auf Agar gebracht.

Da das Agar sehr schnell erstarrt, so wird zum Plattengiessen auch eine Mischung von 2 Proc. Gelatine und 1 Proc. Agar empfohlen.

Beim Erstarren wird an der Oberfläche des Agar etwas Flüssigkeit ausgepresst. das sog. Condensationswasser.

**Blutserum.** Das Blut wird der Carotis eines grösseren Thieres entnommen und in Glascylinder geleitet, die vorher sterilisirt sind. In diesen lässt man es 24 Stunden auf Eis stehen, damit sich das Serum vom Blutkuchen trennt. Das Serum wird dann mit sterilisirten Pipetten in ebenfalls sterilisirte Reagenzröhrchen gefüllt, und dann einer fractionirten Sterilisation unterworfen, indem man es eine Woche lang täglich 4 bis 5 Stunden im Thermostaten einer Temperatur von 56—58 ° C. unterwirft. Dann lässt man es im Thermostaten bei 68 ° C. (nicht höher!) in schräger Richtung erstarren. Auch hierbei bildet sich Condensationswasser.

Wenn sich bei dem Aufsaugen des Blutes Verunreinigungen ausschliessen lassen, so kann man das Blutserum auch sofort bei 68 ° erstarren lassen und dann die Reagenzgläschen mehrere Tage bei Brüttemperatur halten, um diejenigen auszuschalten, in welchen Keime aufgehen.

Menschliches Blutserum gewinnt man aus der Nabelschnur, während die Placenta noch im Uterus sitzt.

Zur Züchtung von Gonokokken verwendet man eine Mischung von 3 Theilen Rinderblut- oder Menschenblutserum mit 1 Theil alkalisirter und filtrirter Bouillon aus: Fleischwasser, Pepton 1 Proc., Kochsalz 0,5 Proc., Traubenzucker 1 Proc. Discontinuirliche Sterilisation an mehreren Tagen.

**Milch** wird in Reagenzgläser oder in Erlenmeyer'sche Kölbchen abgefüllt und 1 Stunde lang in strömendem Dampf sterilisirt.

**Kartoffel.** Dieselben werden sorgfältig abgebürstet, die sog. Augen ausgeschnitten, 1 Stunde lang in 1 proc. Sublimatlösung gelegt und dann $^3/_4$ Stunden lang in mit Watte verschlossenen Gläsern gekocht und dann mit ausgeglühten Messern halbirt. Man kann aber die Kartoffel auch zunächst schälen, dann in Scheiben zertheilen und diese in kleinen Glasdosen sterilisiren.

## III. Das Culturverfahren.

Die Anlegung von Reinculturen wird fast immer eingeleitet durch das Koch'sche Plattenverfahren.

Zu dem Zwecke verflüssigt man vorsichtig drei Röhrchen mit Gelatine und bringt in das erste Röhrchen, nachdem dasselbe auf 40 ° abgekühlt ist, einen Tropfen des zu untersuchenden Materials mittels einer ausgeglühten Platinöse. Nachdem das Impfmaterial durch Schütteln

in der Gelatine gleichmässig vertheilt ist, impft man von dem ersten Röhrchen das zweite und von dem zweiten wieder das dritte, weil aus dem ersten Röhrchen oft die Kolonien zu dicht neben einander wachsen. Dann giesst man die einzelnen Röhrchen auf vorher im Trockenschrank sorgfältig sterilisirte Glasplatten aus, die man auf einem sog. Plattengiessapparat gelegt hat. Letzterer besteht aus einem dreieckigen Gestell mit Stellschrauben, welche unter Zuhülfenahme einer Libelle eine vollständig wagerechte Stellung erlauben. Auf diesem Gestell ruht eine breite, mit Eis gefüllte und mit einer Glasscheibe bedeckte Glasschale und diese nimmt die länglichen Platten auf, auf welchen die Gelatine ausgegossen wird. Vor dem Ausgiessen brennt man am besten den Wattepfropf des Reagenzröhrchens oberflächlich ab und zieht auch das obere Ende desselben unter rotirenden Bewegungen noch einmal durch die Flamme des Bunsenbrenners um etwaige aus der Luft oder von den Fingern herrührende Verunreinigungen auszuschliessen. Ebenso werden die einzelnen Platten vor dem Gebrauch noch einmal über einer Bunsenflamme abgeglüht.

Man giesst die Gelatine derart aus, dass der Rand der Platte überall in einer Breite von $1^1/_2$ cm frei bleibt.

Die einzelnen Platten kommen auf Glasbänkchen übereinander gestellt in eine feuchte Kammer, welche auf dem Boden eine mit $1^0/_{00}$ Sublimatlösung getränkte Lage von Fliesspapier trägt.

Hat man voraussichtlich mit Bakterien zu thun, die nur bei Brüttemperatur wachsen, so verwendet man Agarplatten. Das Verfahren ist hierbei dasselbe, wie bei der Gelatine, nur muss man, weil Agar schneller erstarrt, während der Arbeit die Reagenzgläser in einem Wasserbade von 42 ° C. halten und das Plattengiessen möglichst beschleunigen.

Das Plattenverfahren ermöglicht es von Gemengen verschiedener Bakterien jede einzelne Art getrennt zum Wachsthume zu bringen und zu verfolgen.

Zu dem Zwecke impft man, wenn man mit blossem Auge oder unter Zuhülfenahme des Mikroskops auf den Platten Kolonien von verschiedenem Aussehen gefunden hat, von jeder mittels ausgeglühten Platinnadeln auf verschiedene Nährböden und verfolgt dort deren Wachsthum isolirt.

Selbstverständlich kann man auch von jeder der verschiedenen Kolonieen mikroskopische Präparate anfertigen, entweder so, dass man mit der Nadel etwas Material entnimmt und auf dem Deckglas mit etwas Wasser verreibt, oder so, dass man das Deckgläschen auf die Kolonie andrückt und nun sog. Klatschpräparate herstellt.

Auf in Reagenzgläsern befindliche Gelatine impft man in der Art, dass man den Wattepfropf oberflächlich abbrennt und dann das Glas mit dem Pfropf nach unten gerichtet öffnet, um das Hereinfallen von Luftkeimen zu verhindern. Dann sticht man von unten ein, oder fährt, falls man schräg erstarrte Nährböden verwendet, mit der Nadel über die Oberfläche.

Wenn man direct aus einem Organ, z. B. aus der Milz Stichculturen anfertigen will, so verfährt man, nachdem man dasselbe oberflächlich mit Sublimat abgewaschen und dann mit einem ausgeglühten Messer eine frische Schnittfläche angelegt hat, in ähnlicher Weise, indem man von dieser Schnittfläche mit der Nadel einen Tropfen Gewebssaft entnimmt und dann impft.

Statt auf Platten kann man die Gelatine auch in flache Doppelschalen, sog. Petri'sche Schalen ausgiessen, die dann aber auch in einer feuchten Kammer gehalten werden müssen.

Auf demselben Princip wie die Plattenmethode beruht das Rollverfahren von Esmarch. Hierbei wird in verflüssigte Gelatine geimpft, diese aber nicht ausgegossen, sondern durch Drehen auf der Wand des Reagenzglas ausgebreitet und so eine Trennung der Kolonieen bewirkt.

Eine solche Trennung lässt sich übrigens bis zu einem gewissen Grade auch auf Kartoffeln erreichen, wenn man etwas von dem zu untersuchenden Material, z. B. Magensaft auf eine Kartoffel ausstreicht, dann mit ausgeglühter Nadel von dieser auf eine zweite und von dieser wieder auf eine dritte Kartoffel impft und so Verdünnungen herstellt.

Zur Züchtung von anaeroben Bakterien setzt man den Nährböden reducirende Substanzen, Traubenzucker oder ameisensaures Natron (s. oben) zu. Handelt es sich um Plattenculturen, so kann man einen theilweisen Abschluss der Luft dadurch erreichen, dass man dieselben mit Glimmerplättchen bedeckt. Man kann zu demselben Zwecke bei Stichculturen auch Röhrchen anwenden, die höher als gewöhnlich mit Gelatine gefüllt sind, und daher in der Tiefe die Anaeroben zur Entwicklung kommen lassen.

Auch kann man in besonderen mit zwei Oeffnungen versehene Schalen oder Reagenzgläschen die Luft durch Wasserstoff verdrängen.

Buchner empfiehlt zur Züchtung der Anaeroben die Culturen mit nicht zu fest eingedrücktem Wattepfropf in ein luftdicht abgeschlossenes Gefäss zu bringen, an dessen Boden sich eine Schale mit alkalischer Pyrogalluslösung befindet. (Pyrogallol 1,0 Liqu. Kali caust. 1,0. Aqu. 10,0), welche den Sauerstoff der Luft aufsaugt.

## Uebersicht über die Färbung der verschiedenen pathogenen Bakterien und über ihre wichtigsten Cultureigenschaften.

### Eiterkokken.

Die gewöhnlich im Eiter vorkommenden verschiedenen Kokkenarten, der Staphylococcus pyogenes aureus, citreus, flavus und albus, sowie der Streptococcus pyogenes färben sich alle gut mit den gewöhnlichen wässerigen Anilinfarblösungen, namentlich mit Gentianaviolett und mit Löffler's Methylenblau.

Sie lassen sich sämmtlich auch nach Gram (s. p. 60) färben, und diese Methode ist desshalb besonders zu empfehlen, weil die zahlreichen Eiterkörperchen, die sonst das scharfe Hervortreten der betreffenden Kokkenart erheblich beeinträchtigen, entfärbt werden. Auch hat das Gelingen der Gram'schen Färbung eine differentiell-diagnostische Bedeutung gegenüber anderen ähnlich aussehenden Kokken.

Für Schnitte ist ebenfalls die Gram'sche Färbung (s. p. 63) mit nachfolgender Färbung in Bismarckbraun oder die Weigert'sche Färbung (s. p. 63) mit vorhergehender Lithionkarminfärbung zu empfehlen.

Es ist zu beachten, dass die genannten Kokken nicht nur bei Abscessen und Phlegmonen, sondern auch bei Osteomyelitis, Pyämie, acuter Endocarditis, Endometritis, eiteriger Meningitis etc. gefunden werden.

Der Staphylococcus pyogenes aureus wächst ziemlich schnell, schon bei Zimmertemperatur, besser bei 37° auf Gelatine unter Bil-

dung gelblicher, später orangefarbiger Kolonieen, welche die Gelatine verflüssigen. Auf Agar undurchsichtige gelbliche Rasen, auf Kartoffel dicker orangegelber Belag.

Der Staphylococcus pyogenes citreus bildet citronengelbes Pigment, der Staphylococcus albus weisse Kolonieen. Sonst verhalten sie sich wie der Staphylococcus aureus.

Streptococcus pyogenes wächst gewöhnlich bei Zimmertemperatur schlecht, ohne die Gelatine zu verflüssigen, am besten bei 35—37°. Auf Agarplatten bilden die Kolonieen feine granulirte Pünktchen, in der Stich- und Strichcultur einzelne nicht confluirende Pünktchen. In Bouillon sehr gutes Wachsthum unter Bildung eines flockigen Bodensatzes. Facultativ anaerob. Auf Kartoffeln kein oder sehr kümmerliches Wachsthum.

**Erysipelkokken.**

Der dem Streptococcus pyogenes morphologisch so sehr ähnliche Streptococcus des Erysipels verhält sich auch Farblösungen gegenüber ganz gleich. Er färbt sich auch gut nach Gram.

Erysipelcoccus wächst auch ganz ähnlich wie Streptococcus pyogenes.

**Gonokokken.**

Die Gonokokken liegen zum grossen Theil innerhalb der Eiterzellen, und es erleichtert diese charakteristische Lage die Diagnose sehr. Die Untersuchung geschieht an Deckgläsern, die mit dem Eiter der Harnröhrenschleimhaut, der Cervixschleimhaut, der Tube etc. oder der Conjunctiva bestrichen sind.

In Tripperflecken auf Wäsche kann man die Gonokokken noch nach langer Zeit nachweisen, wenn man die Schüppchen abschabt, in Wasser aufquellen lässt und dann auf dem Deckglas färbt.

Die Färbung geschieht mit wässerigen Farblösungen. Nach Gram entfärben sich die Gonokokken, was für die Differentialdiagnose von Wichtigkeit ist.

Eine Doppelfärbung erreicht man nach folgender Methode;

1) Färben 2—3 Minuten lang in alkoholischer Eosinlösung, eventuell in der Wärme.
2) Absaugen des überschüssigen Eosins mit Fliesspapier.
3) Färben, $^1/_2$ Minute lang, in alkoholischer Methylenblaulösung.
4) Abwaschen in Wasser.

Es erscheinen dann die Kokken blau, die Zellen roth.

J. Schütz empfiehlt folgendes Verfahren:

1) Färben der Deckglastrockenpräparate in einer gesättigten Lösung von Methylenblau in 5-proc. Carbolwasser, 5 bis 10 Minuten lang.
2) 3 Secunden lang verweilen in Essigsäurewasser: Acid. acetic. dilut. 5 Tropfen: Aqua 20.
3) Gründliches Abspülen in Wasser.
4) Nachfärbung in sehr verdünnter Saffraninlösung.
5) Trocknen mit Fliesspapier. Kanadabalsam.

Für Schnittpräparate empfiehlt Touton Färbung mit Carbolfuchsin und nachfolgendes Auswaschen in Alkohol.

Zur Züchtung des Gonococcus bedient man sich des p. 68 angegebenen Nährbodens von Blutserumbouillon oder man bringt den Eiter in Blutserum von 40° und stellt zwei weitere Verdünnungen her.

Dann werden die drei Röhren mit der gleichen Menge von 2-procentigem Agar vermengt, welches auf 40° abgekühlt ist, und von dem Gemisch drei Platten gegossen.

Die Kolonieen sind im Centrum dunkler, in der Peripherie zarter feinkörniger Belag. Im Strich auf Blutserumagar einzelne graue Kolonieen, die später zu einem zähschleimigen Rasen confluiren.

Wachsthum nur bei 37°.

**Pneumoniecoccus** von Fränkel-Weichselbaum.

Der lancettförmige Diplococcus von Fränkel-Weichselbaum kommt am häufigsten bei Pneumonie vor; er ist von einer Kapsel umgeben, die bei der gewöhnlichen Färbungsmethode ungefärbt bleibt. Zu beachten ist aber, dass er sich nicht nur in der Lunge bei croupöser Pneumonie findet, sondern dass er namentlich auch in den Excrescenzen der frischen Endocarditis und in dem Eiter der Cerebrospinalmeningitis oft nachgewiesen ist. Er färbt sich mit den gewöhnlichen wässerigen Farblösungen. Sehr bewährt hat sich mir auch die Färbung in Carbolfuchsin (Fuchsin 1; 5-proc. Carbolwasser 100). Bei mehrstündigem Verweilen in der Lösung erscheint der Coccus selbst intensiv roth gefärbt, die Kapsel hat einen leichten röthlichen Farbenton. Wegen der Kapseldarstellung siehe auch Friedländer's Kapselbacillus.

Der Pneumoniecoccus von Fränkel-Weichselbaum färbt sich, was besonders hervorzuheben ist, auch nach Gram; es ist das ein für die Differentialdiagnose sehr wichtiger Unterschied gegenüber dem Kapselbacillus Friedländer's

Der Pneumococcus wächst langsam, nicht unter 24°. Optimum 35°. Auf Gelatine meist schlechtes Wachsthum, ohne Verflüssigung. Wächst nur auf schwach alkalischem Agar. Auf Agarplatte in Form kleiner, durchsichtiger, feiner Tröpfchen, im Strich ähnlich. Auf Blutserum als schleimiger Ueberzug, der aus einzelnen Tröpfchen zusammengesetzt ist.

**Friedländer's Kapselbacillus.**

Der Friedländer'sche Kapselbacillus färbt sich ebenfalls gut mit wässerigen Farblösungen, wobei die Kapsel ungefärbt bleibt. Er entfärbt sich nach Gram.

Will man die Kapsel in Schnitten mitfärben, so verfährt man folgendermassen:

1) Färben 24 Stunden lang in der Wärme in:

| | |
|---|---|
| conc. alkoholischer Gentianaviolettlösung | 50,0 |
| Aqua destillat. | 100,0 |
| Eisessig | 10,0 |

2) Auswaschen in 1-proc. Essigsäure.
3) Alkohol.
4) Kanadabalsam.

Auf diese Weise färbt sich die Kapsel blassblau, die centrale Partie dagegen tiefblau. Wenn man den Grad der Entfärbung nicht richtig trifft, so bleibt auch die Kapsel dunkelblau gefärbt.

Für Deckglaspräparate hat Friedländer zur Färbung der Kapsel folgendes Verfahren angegeben:

1) Die dreimal durch die Flamme gezogenen Präparate werden einige Minuten lang in Essigsäure gelegt.
2) Entfernen der Essigsäure durch Blasen mit einem Glasrohr und schnelles Trocknen an der Luft.

3) Färben einige Secunden lang in gesättigter Anilinwassergentianaviolettlösung.
4) Abspülen in Wasser; Trocknen zwischen Fliesspapier; Kanadabalsam.

Ribbert verfährt zur Darstellung der Kapsel nach folgender Methode:

1) Färben wenige Minuten lang in einer in der Wärme gesättigten Lösung von:

| | |
|---|---|
| Dahlia | |
| Wasser | 100,0 |
| Alkohol | 50,0 |
| Eisessig | 12,5 |

2) Abspülen in Wasser. Trocknen. Kanadabalsam.

Die Bakterien erscheinen tiefblau, die Kapsel hellblau. Wenn aber die Farblösung zu lange einwirkt, so erscheint auch die Kapsel tiefblau und lässt sich dann nicht mehr von den Kokken unterscheiden.

Der Friedländer'sche Bacillus wächst schon bei Zimmertemperatur gut. Auf Gelatine porzellanartige glänzende Knöpfchen, in Stichcultur weisslichen Strich, ohne zu verflüssigen, Agarstrichcultur weisslicher Rasen, auf Kartoffel gelbliche, feuchte Massen mit Gasentwicklung.

**Sarcina ventriculi.**

Färbt sich mit wässerigen Anilinfarblösungen. Die leicht eintretende Ueberfärbung wird am besten bei Anwendung verdünnter Bismarckbraunlösungen vermieden.

Die verschiedenen Sarcinearten wachsen auf Gelatine, Kartoffeln, Agar, zum Theil auch in Heuinfus.

**Milzbrandbacillen.**

Die Milzbrandbacillen färben sich gut in den gewöhnlichen wässerigen Lösungen. Sie färben sich auch gut nach Gram.

Für Schnittpräparate ist diese letztere Färbung mit nachfolgender Bismarckbraunfärbung (s. p. 63) anzuwenden oder die Weigert'sche Färbung (s. p. 63) mit vorheriger Färbung in Lithionkarmin. Ausserdem giebt aber auch gerade bei Milzbrandschnittpräparaten die einfache Färbung in starker wässeriger Gentianaviolettlösung und nachheriges Auswaschen in absolutem Alkohol (s. p. 62) sehr gute Bilder. Die Kerne sind hellblau, die Milzbrandbacillen dunkelblau gefärbt.

Die Sporenfärbung wird in der p. 65 erwähnten Weise vorgenommen.

Der Milzbrandbacillus wächst auf Gelatine, Agar, Blutserum, Kartoffeln und in Bouillon. Minimum 12 ° C. Optimum 35 °. Maximum 45°.

Auf Gelatineplatten rundliche, leicht gelbliche Kolonieen, bei schwacher Vergrösserung in der Peripherie ein Gewirr von unregelmässigen, welligen Fäden, die oft peitschenschnurartig umbiegen. Im Centrum dichte Knäuel. Langsame Verflüssigung. Gelatinestichcultur weissliche Streifen, unter Verflüssigung eine Wolke bildend, von der seitliche Fortsätze ausgehen. Auf Agar dicker Belag, auf Kartoffel trockene weissliche Rasen, bei Brüttemperatur hier reichliche Sporenbildung.

**Bacillen des malignen Oedems.**

Die Bacillen des malignen Oedems sind etwas schlanker als die Milzbrandbacillen, denen sie sonst sehr ähnlich sehen. Sie färben sich

in wässerigen Lösungen von Gentianaviolett; nach Gram entfärben sie sich.

Nur bei Sauerstoffabschluss züchtbar, am besten bei Körpertemperatur. Auf Gelatineplatten bildet die Cultur kleine glänzende Hohlkugeln, welche mit Flüssigkeit gefüllt sind. In der Gelatinestichcultur Verflüssigung und Trübung unter Bildung von Gasblasen. Auf Agar (am besten mit 2 Proc. Traubenzucker) diffus wolkige Trübung und Gasentwicklung. Züchtung auch im Innern von gekochten Kartoffeln möglich. Bouillon wird anfangs diffus getrübt, später weisslicher Bodensatz.

**Diphtheriebacillus.**

In den diphtheritischen Membramen findet sich eine Anzahl verschiedener Arten von Kokken und Stäbchen, die sich mit den gewöhnlichen Farblösungen gut tingiren. Ausserdem aber hat Löffler ein Stäbchen beschrieben, dass ziemlich kurz und etwas gekrümmt erscheint, und das sich besonders gut mit Löffler's Methylenblau, aber auch mit sonstigen wässerigen Farblösungen färbt und zu der Diphtheritis in ätiologischer Beziehung steht. Nach Gram wird der Diphtheriebacillus entfärbt.

Der Diphtheriebacillus wächst nur bei Temperatur über 20°, Optimum 37°. Auf Gelatineplatte rundliche weisse Kolonieen, ohne zu verflüssigen, in der Gelatinestichcultur kleine rundliche Kolonieen. Besonders günstig ist Glyzerinagar. Hier grauweisse Kolonieen. Auf alkalisch gemachten Kartoffeln grauweisser Belag, auf Fleischinfuspepton-Zuckerserum (3 Theile Rinderblutserum mit 1 Theil Bouillon, welche je 1,0 Proc. Pepton und Zucker und 0,5 Proc. NaCl enthält) dicker, gelblich-weisser, glänzender Ueberzug. Auf diesem Nährboden geht das Wachsthum am schnellsten vor sich.

**Bacillen des Rhinoskleroms.**

Der bei Rhinosklerom gefundene Bacillus besitzt eine Schleimhülle, ähnlich dem Friedländer'schen Kapselbacillus; er unterscheidet sich aber von diesem sehr wesentlich dadurch, dass er sich nach Gram färbt.

Wolkowitsch hat folgende Färbungsmethoden angegeben:

A. Schnitte.

1) Färben 24—48 Stunden lang in Anilinwassergentianaviolett.
2) Abspülen in Wasser,
3) 1—4 Minuten lang in Jodjodkalilösung.
4) Uebertragen in absoluten Alkohol.
5) Nelkenöl, in welchem den Schnitten noch ziemlich viel Farbe entzogen wird.

Statt Jodjodkalilösung kann man auch Pikrinsäure in wässerig-alkoholischer Lösung anwenden. Da diese aber viel schneller entfärbt, so verweilen in ihr die Schnitte nur einige Secunden.

Die Kapseln färben sich nur gut an in Alkohol gehärteten Präparaten.

Die hyalinen Massen im Rhinosklerum färben sich nach Wolkowitsch intensiv mit Methylviolett, Gentianaviolett, Methylenblau und Fuchsin, weniger mit Saffranin, gar nicht mit Hämatoxylin, dagegen sehr gut in Eosin. Daher ist Doppelfärbung mit Hämatoxylin und Eosin sehr zu empfehlen.

B. Deckglaspräparate von Culturen

1) Antrocknen etc.
2) Einige Secunden in 1-proc. Essigsäure.

3) Trocknen.
4) 1 Minute lang in starke Anilinwassergentianaviolettlösung.
5) Abspülen in Wasser.
6) Einige Secunden lang in 1—2-proc. Eosinlösung.
7) Uebertragen in 60-proc. Alkohol.
8) Wasser.
9) Trocknen. Kanadabalsam.

Stepanow empfiehlt für Schnitte folgendes Verfahren:

1) Färben $^1/_4$—1 Stunde lang in Carbolgentianaviolett oder 24—36 Stunden lang in Löffler's Methylenblaulösung.
2) Sehr kurze Extraction mit $^1/_4$ — $^1/_5$ Proc. Essigsäure-haltigem Spiritus oder einfach mit Spiritus.

Der Rhinosklerombacillus zeigt auch in seinem Wachsthum grosse Aehnlichkeit mit dem Friedländer'schen Kapselbacillus.

**Tetanusbacillus.**

Färbt sich gut in wässerigen Anilinfarbstofflösungen; auch nach der Gram'schen Methode gelingt die Färbung.

Der Tetanusbacillus wächst nur bei O-Abschluss, nicht unter 16°. Optimum 36—38°. Dem Nährboden wird 2 Proc. Traubenzucker zugesetzt.

Aus Eiter werden Reinculturen in der Art gewonnen, dass man die zunächst erhaltenen Mischculturen mehrere Tage lang je $^1/_2$ Stunde auf 80° erhitzt, sodass alle Bakterien mit Ausnahme der Tetanussporen abgetödtet werden. Auf Gelatineplatten Wachsthum nach 4 Tagen, weisse, in der Mitte dichte, am Rande feine strahlige Kolonieen, welche die Gelatine langsam verflüssigen. In hoher Strichcultur weisslich-grauer Strich mit zahlreichen Ausläufern nach der Seite. Auf Agar ähnliches Wachsthum. In Traubenzuckerbouillon sehr rasches Wachsthum unter Trübung und starker Gasentwicklung. Später Bodensatz.

Auf Blutserum flache Vertiefungen, später zerspaltet sich der Nährboden.

**Rauschbrandbacillus.**

Färbt sich gut in den gewöhnlichen wässerigen Farbstofflösungen; nach Gram wird er entfärbt.

Der Rauschbrandbacillus wächst nur anaerob, nicht unter 14° C. Optimum 37°. Auf Gelatineplatten granulirte Kolonieen, welche verflüssigen und dann strahlenförmige Fächer in die Gelatine entsenden. In hoher Cultur Gasentwicklung.

**Rotzbacillen.**

Sie färben sich nicht nach Gram. Die einfachen wässerigen Lösungen färben zwar Deckglaspräparate, aber wenig intensiv. Alkalische Lösungen färben viel besser; ebenso Anilinwassergentianaviolettlösung, der gleiche Theile einer Kalilösung 1 : 10 000 zugesetzt sind. Die Mischung muss jedesmal frisch bereitet werden. Vor dem Auswaschen kann in einer schwachen Essigsäurelösung (1-proc.), der etwas Tropaeolin zugesetzt ist, kurze Zeit entfärbt werden. Das letztere hat den Vortheil, dass es das Zellprotoplasma ganz, und die Kerne wenigstens etwas entfärbt und so die Bacillen deutlich hervortreten lässt.

Die Färbung (nach Löffler) ist demnach folgende:

1) Färben 5 Minuten lang in alkalischer Methylenblaulösung oder Anilinwassergentianaviolettlösung mit Kalizusatz.

2) 1 Secunde in durch Tropaeolin weingelb gefärbte Essigsäure.
3) Schnelles Auswaschen in destillirtem Wasser.
4) Alkohol — Oel — Kanadabalsam.

Gewebsschnitte werden ebenso gefärbt; zur partiellen Entfärbung dient aber statt der Tropaeolinessigsäure 5 Secunden langes Verweilen in

| | |
|---|---|
| Aqua dest. | 10,0 |
| concentrirte schweflige Säure | 2 Tropfen |
| 5-proc. Oxalsäure | 1 Tropfen. |

Empfehlenswerth ist es noch, wenn man die Schnitte unmittelbar vor der Färbung einige Minuten in Kalilösung 1 : 10 000 legt.

Es gelingt aber auch, mit dieser Methode nicht, eine ganze isolirte Färbung der Rotzbacillen herbeizuführen.

Kühne empfiehlt zur Färbung der Rotzbacillen das von ihm angegebene Methylenblauverfahren (s. p. 63). Man kann mit demselben auch eine Doppelfärbung verbinden, wenn man dem zum Aufhellen benutzten Terpentinöl etwas Saffranin zusetzt.

Schütz hat für Schnitte das folgende Verfahren empfohlen:

1) Färben 24 Stunden lang in:
conc. alkohol. Methylenblaulösung } zu gleichen
Kalilauge 1 : 1000 } Theilen,
2) Abwaschen in angesäuertem Wasser.
3) 5 Minuten in absoluten Alkohol.
4) Cedernöl, Kanadabalsam.

Alle Methoden haben den Nachtheil, dass sie häufig das Gewebe selbst zu stark mitfärben, oder dass bei genügender Entfärbung des Gewebes auch ein Theil der Bacillen die Farbe verliert. Um diesen Nachtheilen zu begegnen, empfiehlt Noniewicz folgendes Verfahren:

1) Färben 2—5 Minuten in der Löffler'schen Methylenblaulösung.
2) Auswaschen in destillirtem Wasser.
3) Entfärben, 1—5 Secunden lang, je nach der Dicke der Schnitte in einer Lösung von
$^1/_2$-proc. Essigsäure 75 Theile
$^1/_2$-proc. wässerige Lösung von Tropaeolin (00) 25 „
4) Auswaschen in destillirtem Wasser.
5) Ausbreiten auf dem Objectträger, Entwässern der Schnitte, zunächst mit Fliesspapier, dann an der Luft oder über der Spiritusflamme.
6) Aufhellen durch fortwährend aufgetropftes Xylol (Nelken-, Origanum-, Anilinöl zu vermeiden).
7) Kanadabalsam.

Die Rotzbacillen erscheinen dunkel- bis schwarzblau, das Gewebe hellblau gefärbt. Für Schnitte eignet sich auch das von Nikiforoff (s. p. 82) angegebene Färbeverfahren für Recurrensspirillen.

Der Rotzbacillus wächst nicht unter 20 °, Optimum 37 °. Auf Agarplatten (am besten Glyzerinagar) hellgelbe Auflagerungen, in der Strichkultur tröpfchenartige, grauweisse Kolonieen, auf Blutserum in Form kleiner, getrennt bleibender Tröpfchen, sehr charakteristisches Wachsthum auf Kartoffel als gelbbrauner, später dunkelbrauner Belag.

**Bacillus der Mäuseseptikämie.**

**Bacillus des Schweinerothlaufs.**

Beide sind einander in ihrem morphologischen und tinctoriellen

Verhalten sehr ähnlich. Sie färben sich leicht mit wässerigen Farblösungen und nach der GRAM'schen Methode.

Die Bacillen der Mäuseseptikämie und des Schweinerothlaufs verhalten sich auch in der Cultur sehr ähnlich.

Wachsthum bei Zimmertemperatur. Auf Gelatineplatten Wachsthum in der Tiefe in Form von weisslichen Wölkchen, daneben dellenartige Einziehung. Im Stich in Form weisser, nicht umschriebener Wölkchen. Nicht verflüssigend. Auf Agar gelblich-weisse Kolonieen.

**Typhusbacillen.**

Sie finden sich beim Abdominaltyphus in der Darmschleimhaut, im Follikelapparat, in den Mesenterialdrüsen, in der Milz, in der Leber, in den Dejectionen etc. Sie färben sich nicht nach GRAM.

In Deckglaspräparaten sind sie mit den gewöhnlichen wässerigen Lösungen, namentlich auch mit Fuchsin zu färben. Die Färbung gelingt leichter bei Erwärmen. Abspülen in Wasser (nicht Alkohol). In Schnitten unterscheiden sich die Typhusbacillen von einer Reihe von Fäulnissbacillen, denen sie sonst morphologisch sehr ähnlich sind, dadurch, dass sie keine so scharfe Färbung annehmen wie letztere. Für Schnitte sind als Farblösungen besonders geeignet LÖFFLER's Methylenblau oder Carbolfuchsin. Es empfiehlt sich, die Schnitte 24 Stunden in der Farblösung zu belassen und einfach in Wasser abzuspülen, da die Bacillen sich in Alkohol leicht entfärben.

Der Typhusbacillus wächst bei Zimmertemperatur, Optimum 37°. Bildet in Gelatineplattenculturen grauweissliche Kolonien, oft mit einem bräunlichen Schimmer, welche nicht verflüssigen. In der Stichcultur hauptsächliches Wachsthum an der Oberfläche des Einstichs als grauweisser Belag mit zackigem Rand, Agarstrichcultur oberflächlicher weisser Belag. Auf Blutserum längs des Impfstriches weisslicher Belag. Auf Kartoffel in Form eines Häutchens, welches sich von der Kartoffeloberfläche meist nicht unterscheiden lässt.

**Bacterium coli commune.**

Das Bacterium coli commune färbt sich mit den gebräuchlichen Anilinfarben, namentlich mit LÖFFLER'schem Methylenblau oder mit Carbolfuchsin. Bei der GRAM'schen Methode wird es entfärbt.

Wächst bei Zimmertemperatur schon gut. Optimum 37°. Auf Gelatineplatten entstehen ohne Verflüssigung weissliche Kolonieen, die einen gezackten oder auch einen glatten Rand haben. In der Stichcultur ist die Oberfläche halbkugelig oder rosettenförmig, der Stich aus kleinen weissen Punkten zusammengesetzt. Auf Agar gelblicher Rasen, auf Kartoffel brauner Belag, Bouillon wird getrübt.

**Syphilisbacillen.**

Für die sog. Syphilisbacillen ist von LUSTGARTEN folgendes Färbungsverfahren angegeben worden:

1) Färben 24 Stunden lang bei Zimmertemperatur und dann 2 Stunden im Brütofen bei 40° in Anilinwassergentianaviolett.
2) Abspülen in Alkohol absolut. 3—5 Minuten.
3) Entfärben:
   a) in einer 1 ½-proc. wässerigen Lösung von Kali hypermanganicum 10 Secunden, dann
   b) in wässeriger Lösung von reiner schwefliger Säure, wenige Secunden lang.

4) Abspülen in Wasser.
5) Alkohol, Nelkenöl, Xylolkanadabalsam.

Gewöhnlich ist der Schnitt, wenn er in Wasser ausgewaschen wird, noch nicht vollständig entfärbt. Dann muss die Entfärbung (3 a u. b, 4) nochmals wiederholt werden.

Man kann eine Nachfärbung mit Saffranin anwenden.

Ein kürzeres Verfahren ist von Giacomi mitgetheilt worden:

1) Färbung mehrere Minuten lang in heissem Anilinwasserfuchsin.
2) Auswaschen in ganz verdünnter wässeriger Eisenchloridlösung (einige Tropfen Eisenchloridlösung auf eine Schale mit Wasser).
3) Entfärben in conc. Eisenchloridlösung.
4) Auswaschen in Alkohol absolut.

Doutrelepont färbt mit wässeriger Methylviolettlösung 48 Stunden lang und entfärbt in der gleichen Weise wie Giacomi.

Die im Smegma praeputii vorkommenden Bacillen färben sich ebenfalls mit der Lustgarten'schen Methode.

**Tuberkelbacillen.**

Die Färbungsmethode der Tuberkelbacillen beruht auf einem ähnlichen Princip wie die oben (p. 65) angegebene Sporenfärbung. Die mit bestimmten Farbstofflösungen einmal gefärbten Bacillen behalten ihre Färbung auch bei Entfärben mit stärkeren Lösungen von Mineralsäuren bei, während alles übrige im Präparat Befindliche, auch andere Bakterienarten, entfärbt werden. Färbt man nun weiterhin mit einer zweiten Anilinfarbe in einfach wässeriger Lösung, die sich von der ersten für das Auge gut unterscheidet, mit einer sog. Contrastfarbe, nach, so färbt diese die vorher entfärbten Kerne, Bakterien etc., während die Tuberkelbacillen diese zweite Farbe nicht annehmen.

Die von Koch in Anwendung gezogene Lösung war mit Kalilauge zusammengesetzt. Jetzt gebraucht man namentlich Lösungen, die mit Anilinöl oder Carbolsäure bereitet sind. Zur Anwendung kommt Anilinwasserfuchsin resp. Carbolfuchsin mit nachträglicher Contrastfärbung in Methylenblau, und Anilinwassergentianaviolett resp. Carbolwassergentianaviolett und als nachträgliche Contrastfarbe Bismarckbraun.

Ehrlich hat die Hypothese aufgestellt, dass die Tuberkelbacillen eine Hülle besitzen, die nur für alkalische Lösungen durchgängig, für Säuren aber undurchgängig wäre. Wenn diese Hypothese auch nicht strict bewiesen ist, so erklärt sie doch am besten, warum sich die Tuberkelbacillen, nachdem sie einmal mit der alkalischen Farblösung gefärbt sind, der Einwirkung der Säure gegenüber resistent verhalten.

Auch bei der Tuberkelbacillenfärbung wurde im Verlaufe der Untersuchungen das Erwärmen der Farbstofflösung als ein wichtiges Hülfsmittel erkannt, welches namentlich eine ganz beträchtliche Abkürzung der Färbungszeit gestattet.

In neuerer Zeit ist die Tuberkelbacillenfärbung dadurch auch wesentlich vereinfacht worden, dass man durch Vermischen einer Mineralsäure und einer Methylenblaulösung die Entfärbung und die Contrastfärbung in einer einzigen Procedur vereinigt hat (B. Fränkel, Gabbet).

Ausserdem hat sich herausgestellt, dass Carbolsäurefuchsin unerwärmt auch schon in kurzer Zeit die Tuberkelbacillen hinreichend intensiv färbt.

Die Methoden sind für Schnitte und Trockenpräparate annähernd dieselben, nur ist es angebracht, Schnitte länger, bis zu 24 Stunden in der Farbe zu lassen, eventuell bei Brütofentemperatur.

Für die am häufigsten in der Praxis vorkommende Untersuchung von Sputum verfährt man so, dass man aus demselben die mehr bröckligen Partieen mit der Pincette entnimmt und entweder mit dieser auf dem Deckglas vertheilt oder die Vertheilung auf dem Deckglase so bewirkt, dass man ein zweites Deckglas daran abreibt; dann lufttrocken werden lassen, dreimal durch die Flamme ziehen und Färben nach einer der nachfolgenden Methoden.

Um auch vereinzelte Tuberkelbacillen im Sputum und in anderen flüssigen Medien nachweisen zu können, sind zwei Sedimentirungsverfahren empfohlen worden,

A. Sedimentirungsverfahren von Biedert.

15 ccm des zu untersuchenden Sputums werden mit etwa 2 Esslöffel voll Wasser und mit — je nach der Dicke des Sputums — 4 bis 8 Tropfen (nicht mehr!) Natronlauge verrührt, unter fortwährendem Umrühren in einer Schale gekocht und allmählich noch 4—6 Esslöffel Wasser zugesetzt, bis eine dünnflüssige Masse entsteht. Dann lässt man in einem Spitzglas 2 Tage lang sedimentiren, giesst die Flüssigkeit ab, welche über dem Sediment steht, und untersucht dasselbe. Da das Sediment oft viel von der Klebrigkeit des ursprünglichen Sputums verliert, so thut man gut, von letzterem etwas zum Aufkleben des Sediments auf dem Deckglas aufzubewahren. Sehr vortheilhaft wird das Sedimentirungsverfahren nach vorherigem Kochen mit Natronlauge durch die Centrifuge ersetzt.

B. Sedimentirungsverfahren von Stroschein.

5—10 ccm Sputum werden je nach der Consistenz mit der 1—3-fachen Menge einer Mischung von Borax-Borsäurelösung und Wasser im Verhältniss 1 : 3 gemischt und eine Minute lang energisch geschüttelt. Nach 24—48 Stunden ist die Sedimentirung vollendet, man untersucht das Sediment, nachdem man die darüberstehende klare Flüssigkeitsschicht abgegossen hat.

Handelt es sich um den Nachweis von Tuberkelbacillen in Geweben zu rein diagnostischen Zwecken, ohne dass es auf das Lageverhältniss der Bacillen zu den einzelnen Bestandtheilen des Gewebes ankommt, so nimmt man ebenfalls am besten zunächst eine Untersuchung des abgestrichenen Gewebssaftes in Deckglastrockenpräparaten vor, da dieselbe natürlich viel schneller und einfacher zu bewerkstelligen ist als die Untersuchung von Schnittpräparaten. Wenn die Untersuchung des Gewebssaftes nicht zum Ziel führt, kann man noch die Untersuchung von Schnitten anreihen. Die einzelnen jetzt im Gebrauch befindlichen Methoden der Tuberkelbacillenfärbung sind folgende:

I. Verfahren von Ehrlich mit der Modification der Beschleunigung der Färbung durch Erwärmen.

1) Färben 3—5 Minuten lang in Anilinwasserfuchsinlösung (resp. Anilinwassergentianaviolett) (s. p. 88).
2) Entfärben in 20-proc. Salpetersäure $^1/_2$—1 Minute.
3) Auswaschen in 70-proc. Alkohol, bis kein Farbstoff mehr abgegeben wird.

4) Nachfärbung in Methylenblaulösung (resp. Bismarckbraun) $1^1/_2$—2 Minuten.
5) Auswaschen in Wasser.
6) Trocknen zwischen Fliesspapier.
7) Kanadabalsam.

Anmerk. Schnitte werden länger gefärbt und kommen aus dem Wasser in Alkohol, dann in Xylol und schliesslich in Kanadabalsam.

II. Verfahren von Ziehl-Neelsen.

1) 3—5 Minuten langes Färben in erwärmter Lösung von:

| | |
|---|---|
| Fuchsin | 1,0 |
| Alkohol | 10,0 |
| Acid. carbol. conc. | 5,0 |
| Aqua destillata | 100,0 |

2) Entfärben in 5-proc. Schwefelsäure oder 15-proc. Salpetersäure.
3) Auswaschen in 70-proc. Spiritus.
4) Contrastfärbung in wässeriger Methylenblaulösung $1^1/_2$ bis 2 Minuten.
5) Abwaschen in Wasser.
6) Trocknen zwischen Fliesspapier.
7) Kanadabalsam

Anmerk. Bei Schnitten Alkohol, Xylol, Kanadabalsam.

III. Verfahren von Gabbet.

1) Färben 2 Minuten lang (ohne Erwärmen) in:

| | |
|---|---|
| Fuchsin | 1,0 |
| Alkohol | 10,0 |
| 5-proc. Carbolsäurewasser | 100,0 |

2) Abwaschen in Wasser.
3) 1 Minute lang Entfärbung und Contrastfärbung in:

| | |
|---|---|
| Methylenblau | 2,0 |
| 25-proc. Schwefelsäure | 100,0 |

Auswaschen in Wasser.
5) Trocknen und Kanadabalsam; bei Schnitten Alkohol, Xylol, Kanadabalsam.

Das Verfahren von Gabbet ist das für die Praxis am meisten zu empfehlende; es ist sehr einfach, weil die Erwärmung fortfällt und Entfärbung und Contrastfärbung in eine Procedur vereinigt sind. Ausserdem sind die beiden Farblösungen sehr bequem zu bereiten.

Andererseits ist das Verfahren vollkommen sicher, auch für Schnitte.

IV. Verfahren von Czaplewski.

Dasselbe geht von der Voraussetzung aus, dass durch die starke Mineralsäure ein Theil der vorhandenen Tuberkelbacillen entfärbt wird und so dem Untersucher entgehen kann. Es wird daher statt der Mineralsäure Fluorescein angewandt. Das Verfahren, welches hauptsächlich für Deckglaspräparate angegeben ist, ist folgendes;

1) Färben in erwärmtem Carbolfuchsin.
2) Abtropfenlassen des überschüssigen Carbolfuchsins, und Uebertragen in eine Lösung von

Gelbes Fluorescein, concentrirte alkoholische Lösung,
Methylenblau im Ueberschuss.

In diese Lösung wird das Deckglas 6—10 mal eingetaucht, indem man die Flüssigkeit immer langsam wieder abfliessen lässt.

3) Nachfärben in concentrirter alkoholischer Methylenblaulösung.

4) Schnelles Abspülen in Wasser. Trocknen. Kanadabalsam.

Bei Schnitten, in denen es auf das Auffinden ganz vereinzelter Tuberkelbacillen ankommt, sind die Methoden von Ehrlich und Neelsen beizubehalten, weil sie eher gestatten, die Färbung beliebig lange auszudehnen und dementsprechend die Färbung zu modificiren.

Der Tuberkelbacillus wächst nicht unter 30 ° und nicht über 42 °. Optimum 37 °. Da der Tuberkelbacillus nur sehr langsam, erst nach 10—15 Tagen sichtbar, wächst, so kann man ihn aus Bakteriengemischen nicht isoliren. Man verfährt vielmehr so, dass man mit dem betreffenden Material zunächst in die Bauchhöhle von Meerschweinchen oder Kaninchen impft. Von den bei dem Thier entstehenden Tuberkeln legt man dann unter Beobachtung aller Cautelen die Culturen an, indem man kleine Gewebspartikel auf den Nährboden bringt.

Der Tuberkelbacillus wächst sehr gut auf Agar mit 6 proc. Glycerinzusatz. Hier bilden sich grauweisse, trockene Schuppen. Auf Blutserum grauweisse, trockene Schüppchen, welche bei schwacher Vergrösserung wellig gekrümmte zierliche Linien zeigen. Das Condensationswasser wird von einem Häutchen überzogen.

Auch in Kalbfleischbouillon mit 6-proc. Glyzerin gedeiht der Tuberkelbacillus gut; er bildet hier ein die Oberfläche überziehendes Häutchen. Wegen des stärkeren O-Bedürfnisses des Tuberkelbacillus muss man das zu verimpfende Material auf die Oberfläche der Bouillon bringen.

### Leprabacillen.

Sind den Tuberkelbacillen sehr ähnlich; sie färben sich mit denselben Methoden. Ein Unterschied besteht darin, dass die Färbung schneller erfolgt, aber auch viel schneller, zuweilen schon nach Stunden wieder schwindet. Auch die Methode von Gabbet liefert für Schnitte gute und — soweit meine Erfahrungen reichen — ziemlich haltbare Präparate. Zum Unterschiede von den Tuberkelbacillen färben sich aber die Leprabacillen auch mit einfach wässerigen Lösungen.

Färbung nach Baumgarten.

1) Eärbung 6—7 Minuten lang in verdünnter alkoholischer Fuchsinlösung (5 Tropfen concentr. alkoholische Lösung auf ein Uhrschälchen mit Wasser).

2) Entfärben $^1/_4$ Minute lang in saurem Alkohol (Salpetersäure 1 : Alhohol 10).

3) Abwaschen in Wasser.

4) Nachfärbung in Methylenblau, Abwaschen in Wasser etc., Kanadabalsam.

Während die Leprabacillen so als rothe Stäbchen auf blauem Grunde erscheinen, färben sich Tuberkelbacillen mit dem angegebenen Verfahren in der kurzen Zeit nicht.

Andererseits kann man nach Lustgarten zur differentiellen Diagnose zwischen Tuberkel- und Leprabacillen die Thatsache verwerthen, dass die in Anilinwassergentianaviolett oder Anilinwasserfuchsin gefärbten Leprabacillen durch eine 1-proc. Lösung von unterchlorigsaurem Natron nicht so leicht entfärbt werden, wie Tuberkelbacillen.

**Cholerabacillen.**

Die Cholerabacillen färben sich namentlich gut in concentrirten wässerigen Fuchsinlösungen. Man thut gut, die Farblösung 10 Minuten lang einwirken zu lassen. Nach Gram entfärben sie sich. Schnitte werden mit Fuchsinlösung oder Methylenblau gefärbt.

Die Cholerabacillen wachsen nicht unter 16°. Optimum 30°—40°. Auf Gelatineplatten kleine granulirte Kolonien mit unebenem Rand, welche durch stärkeren Glanz ein glasscherbenähnliches Aussehen erhalten. Bei weiterem Wachsthum Verflüssigung, angezeigt durch eine oberflächliche Einsenkung.

In der Stichcultur entsteht eine trichterförmige Verflüssigung an der Oberfläche und durch Verdunstung eine luftblasenartige tiefe Einsenkung. Die Bakterien sinken auf den Boden des Verflüssigungstrichters.

Auf Agar graubraune Kolonieen. Auf Kartoffeln Wachsthum, am besten bei 30°—40°, bei Zimmertemperatur ausbleibend: graue bis graubraune, später verflüssigende Massen. Bouillon wird getrübt meist unter Bildung eines Oberflächenhäutchens.

Will man Darminhalt auf Cholerabakterien untersuchen, so kann man zunächst Deckglaspräparate färben. Vor Allem aber wendet man das von Schottelius empfohlene Verfahren an, den Darminhalt mit der gleichen Menge alkalischer Bouillon zu verdünnen und in einem Glas mit breiter Oeffnung offen stehen zu lassen. In Folge ihres grossen Sauerstoffbedürfnisses entwickeln sich die Cholerabacillen hauptsächlich an der Oberfläche, so dass Präparate, die von da entnommen sind, immer reichlich Kommabacillen enthalten.

**Recurrensspirillen.**

Zur Färbung der Recurrensspirillen im Blut hat Günther ein Verfahren angegeben, welches bezweckt, das Hämoglobin der rothen Blutkörperchen zu extrahiren und diesen die Färbbarkeit zu nehmen, damit die gefärbten Spirillen um so besser hevortreten.

1) Die Deckglaspräparate werden dreimal durch die Flamme gezogen, oder besser für 5 Minuten in den Thermostaten bei 75° gelegt.
2) 10 Secunden langes Abspülen in 5-proc. Essigsäure.
3) Entfernen der Essigsäure, zuerst durch Wegblasen mittels einer Glasröhre, dann dadurch, dass man das Deckglas mehrere Secunden lang mit der Präparatenseite nach unten über starke Ammoniaklösung hält.
4) Färben in wässerigen Lösungen von Anilinfarben.
5) Abspülen in Wasser, Trocknen, Kanadabalsam.

Färbung der Recurrensspirillen in Schnitten nach Nikiforoff:

1) Härtung 24 Stunden lang in einer Mischung von
   Kali bichromicum, 5-proc. wässerige Lösung. } gleiche
   Sublimat, gesättigte Lösung in 0,6-proc. Na-Cl-Lösung. } Theile.
2) Nachhärtung in warmem Raume in 70—85—95-procentigem Alkohol.
3) Paraffineinbettung.
4) Färben 24 Stunden lang in einer Mischung von
   Spirituöse 1-proc. Tropäolinlösung, 5 ccm.
   Concentrirte wässerige Methylenblaulösung 10 ccm.
   Aetzkalilösung (1 : 1000) 2 Tropfen.

5) Abspülen mit Wasser.
6) 2—3-maliges Untertauchen in Alcohol. absolut. und Aether zu gleichen Theilen.
7) Bergamottöl — Xylol.

**Aktinomycespilz.**

Wenn man Eiter auf Aktinomycespilze zu untersuchen hat, so sucht man in demselben nach den charakteristischen weisslichen Körnchen. Man breitet dazu den Eiter am besten auf einer Glasplatte aus und untersucht auf einer dunklen Unterlage. Wenn man Körnchen gefunden hat, so zerquetscht man sie vorsichtig zwischen Objectträger und Deckglas und findet dann bei der mikroskopischen Untersuchung ohne Mühe die eigenthümlichen Rasen und birnförmigen Ausläufer oder Kolben.

Man kann natürlich auch Deckglastrockenpräparate herstellen und dieselben wie Schnitte färben.

Für die Untersuchung des Aktinomyces in Schnitten sind eine ganze Anzahl von Methoden angegeben worden, die indes meist an dem Uebelstande leiden, dass sie nicht constant gute Präparate geben, oft färben sich die verschiedenen Pilzrasen in ein und demselben Schnitte verschieden. Zum einfachen Nachweis in Schnitten genügen Doppelfärbungen mit Hämatoxylin und Karmin oder Eosin, durch welche die Drusen mit rother Farbe in dem blauen Gewebe hinreichend deutlich hervortreten. Ebenso gute Präparate erhält man durch die van Gieson'sche Methode.

Sehr gute Präparate erhält man durch die Weigert'scher Bakterienfärbung (s. p. 63) mit vorhergehender Lithionkarminfärbung. Die Differenzirung des Rasens ist hierbei so schön, wie bei keiner anderen Methode.

Sehr empfehlenswerth sind die beiden folgenden Combinationen mit Weigert'scher Färbung, da sie eine gute Differenzirung der Rasen gegenüber den Kolben geben, und auch die übrigen Gewebsbestandtheile schön gefärbt werden.

I. Deckglasfärbung:
1) Aufstreichen des Druseninhaltes auf ein Deckglas, Lufttrocknen, Durchziehen durch die Flamme.
2) Färben 24 Stunden lang in Anilinwassersaffranin.
3) Kurzes Abspülen in Wasser.
4) Färben 5 Minuten lang in gesättigter Anilinwassergentianaviolettlösung.
5) Kurzes Abspülen in 0,6-proc. Kochsalzlösung.
6) Trocknen zwischen Fliesspapier.
7) Uebertragen des Deckglases auf 2 Minuten in Jodjodkalilösung 1 : 2 : 300.
8) Trocknen zwischen Fliesspapier.
9) Entfärben in häufiger gewechseltem Anilinöl, bis das Präparat keine Farbe mehr abgiebt.
10) Entfernen des Anilinöls mit Xylol; Kanadabalsam.

Pilzrasen blau, Kolben braunroth; die Gentianaviolettfärbung ist immer an zweiter Stelle auszuführen.

II. Für Schnitte.
1) Färben 24—48 Stunden in Anilinwassersaffranin.
2) Gründliches Auswaschen in Wasser.

3) Färben $^1/_2$—1 Minute in Hämatoxylin.
4) Gründliches Auswaschen in Wasser.
5) Färben $^1/_2$—3 Stunden in gesättigter Anilinwassergentianaviolettlösung.
6) Abspülen in 0,6-proc. Kochsalzlösung.
7) Uebertragen auf 2—5 Minuten in Jodjodkalilösung 1 : 2 : 300.
8) Trocknen auf dem Spatel mit Fliesspapier.
9) Entfärben in Anilinöl, bis der Schnitt keine Farbe mehr abgiebt.
10) Färben in Anilinöleosin $^1/_2$ Stunde.
11) Entfernen des Anilinöls in Xylol; Kanadabalsam.

Pilzrasen dunkelblau, Kolben braunroth, Zellkerne violett, Protoplasma rosaroth.

Die Gram'sche Methode, mit 24-stündiger Färbung, giebt ebenfalls gute Resultate, hat aber den Nachtheil gegenüber der Weigert-schen, dass in dem absoluten Alkohol das Celloidin gelöst wird, und dann oft die Drusen zum Theil ausfallen.

Bostroem empfiehlt statt der Weigert'schen und Gram'schen Färbung folgendes Verfahren:

1) Färbung in Anilinwassergentianaviolett.
2) Directe Uebertragung, ohne vorheriges Abwaschen, in Weigert'sches Pikrokarmin.
3) Gründliches Abspülen in Wasser.
4) Uebertragen in Alkohol; Ausziehen des Gentianavioletts, bis die Schnitte rothgelb sind.

Der fädige Theil des Aktionomyceskernes erscheint blass, die Keulen roth, das umliegende Gewebe rothgelb.

Durchschnitte durch einzelne Aktinomyceskörner gelingen gut, wenn man sie sorgfältig in Celloidin einbettet.

Weigert hat noch eine Färbung mit Orseille angegeben:

1) Färbung eine Stunde lang in einer dunkelrothen Lösung von Orseille in

| | |
|---|---|
| Alkohol absolut. | 20,0 |
| Acid. acetic. | 5,0 |
| Aqua destillat. | 40,0 |

2) Abspülen in Alkohol.
3) Färbung in 1-proc. wässeriger Gentianaviolettlösung.
4) Auswaschen in Alkohol.
5) Kanadabalsam.

Die Kerne der Zellen werden dabei blauviolett, das Bindegewebe orange, die inneren Partieen des Strahlenpilzes verwaschen blau, die Aussenpartien rubinroth.

Die käufliche Orseille muss man vor der Lösung einige Tage an der Luft stehen lassen, damit das Ammoniak verdampft.

Nach Israel kann man durch ein mehrstündiges Färben der Schnitte in einer concentrirten Lösung von Orcein in durch Essigsäure angesäuertem Wasser eine burgunderröthe Färbung der Aktinomyceskolben erzielen.

Färbung von Baranski:

1) Färben der Deckgläschen oder Schnitte 2—3 Minuten lang in Pikrokarmin.
2) Kurzes Auswaschen in Wasser.

3) Trocknen resp. in Alkohol entwässern.
4) Kanadabalsam.

Das Gewebe erscheint roth, das Centrum des Strahlenpilzes gelb. Die Färbung der Kolben ist keine intensive.

Flormann empfiehlt das folgende Färbungsverfahren, welches im Wesentlichen der Kühne'schen Modification der Gram'schen Methode entspricht:

1) 5 Minuten langes Färben in:
   concentrirte alkohol. Methylviolettlösung 1 Theil
   Wasser 2 Theile
   1-proc. wässerige Lösung von kohlensaurem Ammoniak 2 „
2) 10 Minuten langes Auswaschen in reichlichem Wasser.
3) Uebertragen in eine Jodjodkaliumlösung (1:2:300) für 5 Min.
4) Gründliches Auswaschen in Wasser.
5) Ausziehen der Farbe 20 Minuten lang in einmal zu wechselndem Fluoresceinalkohol (1:50).
6) Auswaschen des Fluoresceins in 95-proc. Alkohol.
7) Uebertragen in Anilinöl für einige Minuten.
8) Lavendelöl.
9) Xylol; Kanadabalsam.

Der Pilzrasen erscheint dunkelblau und sehr schön differenzirt; die Kolben zum Theil hellblau, zum Theil farblos.

Der Aktinomyces wächst nur bei Sauerstoffabschluss und bei Brutemperatur. Auf Ager isolirte weisse Pünktchen, welche sich langsam vergrössern und dann als kleine Knötchen über die Oberfläche prominiren. Daneben kommen auch grössere weissliche Knoten vor.

---

## Zwölftes Capitel.

## Untersuchung von Schimmel- und Sprosspilzen.

Zur Untersuchung der beim Menschen vorkommenden Fadenpilze werden die von den Pilzen durchwachsenen Gewebe in Wasser oder 0,6-proc. Kochsalzlösung zerzupft; meist gelingt es auf diese Weise schon, sich die einzelnen Bestandtheile der Pilze zur Anschauung zu bringen. Sind die betreffenden Gewebe wenig durchsichtig, so kann man sie durch Anwendung einer 1—3-proc. Kali- oder Natronlauge aufhellen. Glyzerin und Alkohol verursachen eine erhebliche Schrumpfung der Pilzfäden.

Ganz besonders empfiehlt sich nach C. Fraenkel Zerzupfen in 50-proc. Alkohol, dem einige Tropfen Ammoniak zugesetzt sind. Man überträgt dann das möglichst fein zerzupfte Material zur mikroskopischen Untersuchung in Glyzerin, in welchem man die Pilze nach Wachsumrandung und Umziehen mit Lack auch als Dauerpräparate conserviren kann. Zur Härtung von Gewebstheilen, die mit Fadenpilzen durchwachsen sind, benutzt man gewöhnlich absoluten Alkohol, um ein postmortales Auswaschen möglichst bald und sicher zu verhindern. In Müller'scher Flüssigkeit ist dagegen die Schrumpfung

geringer. Zur Färbung eignet sich am besten Vesuvin und Methylenblau, doch verhalten sich die verschiedenen Species gegen die einzelnen Anilinfarben verschieden.

Aspergillus färbt sich mit Fuchsin, Methylviolett und Vesuvin.

Die Dermatophyten untersucht man nach Balzer so, dass man die mit denselben behafteten Haare, Schuppen etc. zuerst mit Alkohol und Aether entfettet. Danach werden sie einige Secunden mit wässeriger oder alkoholischer Lösung von Eosin oder in anderen Anilinfarben gefärbt, und dann nach Entwässerung in Alkohol in Kanadabalsam eingelegt. Will man die Präparate nicht conserviren, so untersucht man in 33-proc. Kalilauge.

Die verschiedenen **Hefearten**, wie sie sich namentlich im Magen finden, färbt man am besten mit dünner Bismarckbraunlösung, da sie sich mit den übrigen Anilinfarben sehr leicht überfärben.

Die Schimmelpilze werden in derselben Weise gezüchtet wie Bakterien. Sie bevorzugen im Allgemeinen saure Nährböden und bedürfen reichlich Sauerstoff zur Entwicklung. Ausser anderen Nährböden ist auch Brodbrei sehr geeignet.

---

## Dreizehntes Capitel.

## Untersuchung der thierischen Parasiten.

Die Untersuchung der thierischen Parasiten bietet, sofern es sich nicht um eingehendere Untersuchung ihres Baues handelt, keine Schwierigkeiten. Viele, z. B. Acarus scabiei, Acarus folliculorum, Oxyuris vermicularis, Trichocephalus dispar, Anchylostomum duodenale, Trichina spiralis, Distoma hepaticum und lanceolatum, können ohne weiteres in Wasser untersucht werden. Häufig ist es dabei von Vortheil, durch einen mässigen, mit dem Stiel einer Präparirnadel ausgeübten Druck auf das Deckgläschen das betreffende Thier platt zu drücken. Die Eier der Nematoden, Trematoden, und Cestoden werden ebenfalls in Wasser untersucht.

**Muskeltrichinen** können in Zerzupfungpräparaten untersucht werden; ein sehr schnell zu bewerkstelligendes Verfahren besteht darin, dass man kleine Partikelchen Fleisch zwischen zwei Objectträger zu einem durchsichtigen Brei zerquetscht und dann mit schwacher oder mittlerer Vergrösserung untersucht.

Man wählt zur Untersuchung namentlich Stücke vom Zwerchfell und von der Kiefermusculatur, und zwar vorzugsweise Stückchen aus den der Sehne benachbarten Theilen des Muskels.

Auch Schnittpräparate kann man auf Trichinen untersuchen. Man schneidet entweder direct oder nach vorheriger Celloidineinbettung auf dem Gefriermikrotom. Die Schnitte dürfen nicht zu dünn gemacht werden; dickere Schnitte kann man mit wässerigen Lösungen von Methylgrün (1 : 30) färben. Die Trichinenkapseln treten dann besser hervor.

Eingekapselte und verkalkte Trichinen kann man durch Säurezusatz durchsichtig machen.

**Protozoen** werden mit Vortheil mit fixirenden und färbenden Reagentinen wie Osmiumsäure, Chromsäure, Jod, Anilinfarben etc. behandelt.

Darminhalt mit Protozoen bringt man zunächst ohne Zusatz oder mit Kochsalzlösung vermischt unter das Mikroskop. Sehr empfehlenswerth ist starke Eosinfärbung, eventuell mit vorhergehender Hämatoxylinfärbung.

**Coccidien** färben sich in gehärteten Präparaten gut mit Gentianaviolett und Vesuvin. Empfehlenswerth ist ausserdem Doppelfärbung mit Hämatoxylin und Eosin, wobei man das Eosin in ziemlich starker Lösung und mehrere Stunden einwirken lässt.

**Malariaplasmodien.** Das frische Blut untersucht Plehn in der Art, dass er auf den Objectträger sowohl, wie auf das Deckglas einen Tropfen flüssiges Paraffin bringt. Der Blutstropfen wird direct auf dem Paraffintropfen des Deckgläschens aufgefangen und letzteres dann auf den Objectträger so aufgesetzt, dass sich das Blut zwischen den beiden Paraffinlagen befindet. Die Untersuchung geschieht auf heizbarem Objecttisch. Zur Färbung von Blutpräparaten dient am besten Methylenblau in schwacher wässeriger Lösung; besonders geeignet ist eine ganz dünne Lösung des Farbstoffes in steriler Ascitesflüssigkeit oder in Blutserum. Dieser Lösung kann man zu Doppelfärbungen etwas Eosin zusetzen. Plehn empfiehlt zu diesem Zweck 5—6 Minuten langes Färben der in absolutem Alkohol fixirten Deckglaspräparate in einer Lösung von:

| | |
|---|---|
| Methylenblau, concentrirte wässerige Lösung | 60,0 |
| Eosin, $^1/_2$-proc. Lösung in 75-proc. Spiritus | 20,0 |
| Destillirtes Wasser | 20,0 |
| 20-proc. Kalilauge | 12 Tropfen. |

Zur Fixirung von Gewebsstücken verfährt man nach Bignami in folgender Weise:

1) Fixirung $^1/_2$ bis mehrere Stunden lang in einer Lösung von

| | |
|---|---|
| Sublimat | 1,0 |
| Chlornatrium | 0,75 |
| Essigsäure | 0,5—1,0 |
| Wasser | 100,0 |

2) Uebertragung in Alkohol, dem etwas Jodtinctur zugesetzt ist.
3) Absoluter Alkohol.

Zum Färben dient Magentaroth (v. Dr. Grübler, Leipzig), in gesättigter wässeriger Lösung oder in Carbolwasser gelöst, und nachfolgendes Auswaschen in absolutem Alkohol.

Zu Doppelfärbungen eignet sich eine Mischung von Magentaroth und Aurantia in gesättigter alkoholischer Lösung.

Die Köpfe der **Bandwürmer** betrachtet man mit schwacher und mittelstarker Vergrösserung in Wasser oder Kochsalzlösung oder Glyzerin. Echinococcusscolices kann man mit einem Skalpell von der Wand der Blasen abschaben und in Wasser oder verdünntem Glyzerin untersuchen. Die sporenförmigen Hacken sind oft noch in Zerzupfungspräparaten von abgestorbenen und verkalkten Echinokokken nachweisbar.

Den Scolex des Cysticercus cellulosae kann man sich durch Zerreissen der Blase frei machen. Danach wird er zur Untersuchung des Hackenkranzes und der Saugnäpfe unter dem Deckglase zerquetscht.

Durch Compression eines frischen reifen Bandwurmgliedes zwischen zwei Objectträgern kann man sich auch die Verzweigung des mit Eiern gefüllten Uterus zur Anschauung bringen.

Durchschnitte durch die Wand einer Echinococcusblase, mit einem Rasirmesser oder auch nur mit einer Scheere ausgeführt und in Wasser untersucht, zeigen sehr deutlich die Schichtung der Cuticularmasse.

Zur Aufbewahrung und Härtung wird gewöhnlich Spiritus benutzt. In Müller'scher Flüssigkeit werden die Blasen leicht spröde. Wenn die einzelnen Theile bei Anlegung von Schnitten auseinanderfallen, so wendet man Celloidineinbettung an. Zur Färbung benutzt man kernfärbende Farben allein oder zusammen mit Eosin oder Karmin.

Die mikroskopischen Präparate können sowohl in Glyzerin wie in Kanadabalsam aufgehoben werden. Ersteres ist namentlich bei ungefärbten Präparaten zu empfehlen.

---

## Vierzehntes Capitel.

## Uebersicht über die Behandlung der einzelnen Gewebe und Organe zum Zwecke der mikroskopischen Untersuchung.

### Untersuchung des Blutes.

Die Untersuchung des Blutes kann vorgenommen werden

1) am frischen Präparat, mit oder ohne Zusatz von sog. Conservirungsflüssigkeiten;
2) am Deckglastrockenpräparat, mit oder ohne Fixation der Blutzellen in sog. Fixirungsflüssigkeiten, und mit nachheriger Anwendung der verschiedenen Färbungsmethoden.
3) an Schnittpräparaten des fixirten und gehärteten Blutes, ebenfalls mit Anwendung verschiedener Färbemethoden.

In der Regel bedarf es der combinirten Anwendung mehrerer dieser Methoden, um zu einem sicheren Resultat zu kommen.

#### I. Untersuchung des Blutes im frischen Präparat.

Zur frischen Untersuchung des Blutes bringt man am besten ein ganz kleines Tröpfchen zunächst auf die Mitte des Deckglases und legt dieses dann vorsichtig auf den gereinigten Objectträger auf. Es ist immer darauf zu achten, dass man eine möglichst geringe Menge von Blut auf den Objectträger bringt, weil man die feineren Structuren der Blutkörperchen nur an ganz dünnen Schichten studiren kann. Oft ist es empfehlenswerth, die Entnahme des Blutes in der Art vorzunehmen, dass man ein Deckgläschen mit Wachs auf dem Objectträger befestigt, den Blutstropfen in den so entstehenden Capillarraum einfliessen lässt und diesen dann durch eine vollständige Wachsumrandung definitiv schliesst. In dieser Weise kann man auch Blut am Kranken-

bett entnehmen und die Untersuchung dann später zu passender Zeit anschliessen. Man kann auch nach der Methode von Plehn (s. p. 87) das Blut zwischen zwei Paraffintropfen auffangen. Da sich die Blutkörperchen in destillirtem Wasser sowie in Säuren sehr rasch verändern und namentlich ihr Hämoglobin sehr rasch extrahirt wird, so muss man sog. **Conservirungs-** oder indifferente **Zusatzflüssigkeiten** wählen.

Zur Härtung und Conservirung des Blutes dienen folgende Flüssigkeiten:

1) Physiologische Kochsalzlösung. Sehr geeignet. Der zwischen 0,6 und 0,75 Proc. schwankende Concentrationsgrad muss nach Bizzozero für jede einzelne Thierspecies ausprobirt werden.
2) Blutserum, Lymphe oder Amnioswasser von derselben Thierart. Diese Flüssigkeiten können noch mit Jod versetzt werden, oder man kann auch vom Rande des Deckgläschens her eine färbende Flüssigkeit, z. B. Methylgrün in 0,6-proc. Kochsalzlösung, zufliessen lassen.
3) Weingelbe Jodjodkaliumlösung ist namentlich geeignet, um die Schatten der rothen Blutkörperchen sichtbar zu machen.
4) Gesättigte wässerige Pikrinsäurelösung hat dieselbe Fähigkeit.
5) 0,5-proc. Argentum-nitricumlösung.
6) Pacini'sche Flüssigkeit:

| | |
|---|---|
| Hydrargyr. bichlorat. | 1,00 |
| Chlornatrium | 2,00 |
| Aqu. destillat. | 200,0 |

7) Hayem'sche Flüssigkeit.

| | |
|---|---|
| Sublimat | 0,5 |
| Chlornatrium | 1,0 |
| Schwefelsaures Natron | 5,0 |
| Aqu. destillat. | 200,0. |

Das Blut wird mit dieser Flüssigkeit im Verhältniss 1 : 100 gemischt. Beim ruhigen Stehen sinken die geformten Elemente des Blutes zu Boden. Nach 12—24 Stunden decantirt man, und man kann dann die so erhaltenen gehärteten Elemente auswaschen und färben. Man kann aber auch der Härtungsflüssigkeit direct Eosin zusetzen.

Die Anwendung dieser Zusatzflüssigkeiten ist dadurch begrenzt, dass sich Dauerpräparate mit ihnen nicht herstellen lassen und dass sie Structurveränderungen des Zellkerns nicht sicher verhindern.

Diesen Nachtheilen begegnet man durch die Anwendung **fixirender Mittel,** durch welche allerdings die äussere Form der Zellen meist verändert wird.

Es sind hier zu nennen:

1) Essigsäure, am besten 1-proc.
2) Osmiumsäure, 1—2-proc.
3) Flemming'sche Lösung, von manchen Autoren in der Weise modificirt, dass eine Chromsäurelösung von niedrigerem Procentsatze gewählt wird.

Die Färbung geschieht entweder durch Zusatz zu der Fixirungsflüssigkeit (z. B. Methylgrün, Methylviolett, Saffranin etc.) oder durch

nachherige Tinction, nachdem von dem Blute Schnittpräparate (s. unten) angefertigt sind.

## II. Deckglastrockenpräparate.

Bei der Färbung von Deckglastrockenpräparaten muss man darauf Rücksicht nehmen, dass das Hämoglobin durch die wässerigen Farblösungen extrahirt wird.

Als einen Farbstoff, welcher das Hämoglobin nicht löst, bezeichnet Hayem die Jodjodkaliumlösung. Bringt man eine derartige Lösung von ziemlich intensiv brauner Farbe auf das getrocknete Blutpräparat, so nehmen alle hämoglobinhaltigen Theile sofort eine braune bis violette Farbe an. Es ist daher die Methode die einfachste, um bei Säugethieren auf das Vorhandensein von kernhaltigen rothen Blutkörperchen zu untersuchen.

Man kann aber, wie Ehrlich gezeigt hat, das Hämoglobin seiner Löslichkeit und Quellungsfähigkeit berauben, wenn man das auf einem Deckgläschen ausgestrichene Präparat, nachdem es lufttrocken geworden ist, eine oder mehrere Stunden auf einem Kupferblech auf 120—150° erhitzt hält. Nach Nikiforoff erreicht man denselben Zweck noch bequemer, wenn man die lufttrocken gewordenen Deckglaspräparate 2 Stunden lang in eine Mischung von Alkohol und Aether zu gleichen Theilen bringt, dann abtrocknet und nun färbt.

Hayem empfiehlt zu demselben Zwecke die Einwirkung von Osmiumdämpfen auf das getrocknete Präparat.

Zur Entnahme des Blutes verfährt man so, dass man einen möglichst kleinen Bluttropfen direct auf ein Deckgläschen bringt, mit einem zweiten Deckgläschen überdeckt und dann dieselben nach erfolgter Ausbreitung des Tropfens vorsichtig auseinanderzieht. Dabei ist es nöthig, dass man die Deckgläschen nicht mit den Fingern, sondern mit Pincetten fasst, weil, wie Ehrlich angiebt, schon der Dunstkreis des manipulirenden Fingers genügt, um Blutkörperchen in erheblicher Weise zu modificiren.

Zur Untersuchung des Blutes ist es zunächst wichtig, die verschiedenen Arten der weissen Blutzellen zu kennen, die im Blute vorkommen; es finden sich darin nach Ehrlich:

1) Kleine Lymphocyten. Sie sind nur wenig kleiner als die rothen Blutkörperchen und besitzen einen grossen, intensiv färbbaren Kern, der die Hauptmasse der Zelle ausmacht, so dass nur ein ganz schmaler Protoplasmasaum um den Kern herum vorhanden ist.

2) Grosse Lymphocyten. Dieselben stellen ein weiteres Entwicklungsstadium der kleinen Lymphocyten dar, sie sind 2—3mal so gross als rothe Blutkörperchen und besitzen ebenfalls einen grossen Kern, der aber, im Gegensatz zu den kleinen Lymphocyten, von einem deutlichen breiteren Protoplasmasaum umgeben ist. Der Kern ist etwas schwächer tingirbar als der der kleinen Lymphocyten. Die kleinen und grossen Lymphocyten machen im normalen Blut 25 Proc. aller weissen Blutzellen aus.

3) Die mononucleären Elemente oder Uebergangsformen unterscheiden sich von den grossen Lymphocyten dadurch, dass ihr Kern nicht gleichmässig rund ist, sondern in der Mitte eine Einbuchtung zeigt.

4) Die polynucleären Leukocyten. Dieselben sind kleiner als die mononucleären Uebergangsformen, aber grösser als rothe Blutkörperchen. Sie besitzen entweder einen mehrfach gelappten Kern oder mehrere, intensiv färbbare Kerne. Sie machen etwa 70 Proc. aller weissen Blutzellen des normalen Blutes aus und besitzen die Fähigkeit der Emigration.

5) Eosinophile Zellen. Der Kern färbt sich weniger dunkel als der der polynucleären Leukocyten. Die Körnungen, die im Protoplasma vorhanden sind (s. unten), färben sich mit Eosin intensiv roth.

Ehrlich hat nun des Weiteren nachgewiesen, dass die weissen Blutkörperchen in ihrem Protoplasma, ausserhalb des Kerns, Körnungen oder Granulationen enthalten, die ein ganz verschiedenes Verhalten gegenüber bestimmten Gruppen von Anilinfarben zeigen, und dass man nach diesem Verhalten verschiedene Arten von Granulationen unterscheiden kann, die er als $\alpha$-, $\beta$-, $\gamma$-, $\delta$-, $\varepsilon$-Granulationen bezeichnet. Dass es sich hier übrigens um wirkliche chemische Verschiedenheiten handelt, geht daraus hervor, dass die verschiedenen Körnungen auch andere constante Differenzen erkennen lassen:

1) in ihrem Verhalten gegen Lösungsmittel: Wasser, Säuren. Alkohol, Glyzerin;
2) in ihrer Grösse, Form und Lichtbrechung;
3) in ihrem Verhalten gegen höhere Temperaturen;
4) in der Vertheilung der Körnung im Zellleib.

A) Wichtig sind zunächst die eosinophilen Zellen, d. h. solche, die durch saure Anilinfarben, vor allem durch Eosin, eine intensive Färbung ihrer Granulationen erkennen lassen, = $\alpha$-Körnung oder $\alpha$-Granulationen. Zur Färbung der eosinophilen Zellen verfährt man in folgender Weise:

1) Deckglaspräparat, mehrere Stunden auf 120° erhitzt.
2) Mehrere Stunden Färbung in der Ehrlich'schen sauren Hämatoxylin-Eosinlösung (s. p. 35).
3) Abwaschen in Wasser, Trocknen, Kanadabalsam.

Die Kerne der weissen Blutkörperchen, sowohl der Lymphocyten wie der polynucleären, sind dann ganz dunkel gefärbt, die Kerne der mononucleären bläulich-grau, die rothen Blutkörperchen sind kupferroth gefärbt, die eosinophilen Granulationen sind roth.

Man kann auch eine Färbung der nach obiger Methode behandelten Deckgläser vornehmen in:

| | | |
|---|---|---|
| Aurantia<br>Indulin<br>Eosin | ana | 2,0 |
| Glyzerin | | 30,0 |

Auswaschen in Wasser. Trocknen. Kanadabalsam.

Die Zellkerne sind blau, die eosinophilen Zellen roth oder rothschwarz, die rothen Blutkörperchen kupferroth.

Will man die eosinophilen Zellen allein, unter Verzicht auf Kernfärbung darstellen, so färbt man mit einer einfachen Eosinlösung. Am besten eignet sich stark rothe Eosinglyzerinlösung; nachheriges Abspülen in Wasser. Die Darstellung dieser eosinophilen Zellen ist von ganz besonderer Wichtigkeit, weil Ehrlich gezeigt hat, dass dieselben bei gewöhnlichen acuten Leukocytosen nicht vermehrt, dass sie dagegen bei der Leukämie erheblich vermehrt sind. Im normalen Blut sind

sie selten. Nach Ehrlich genügt für die sichere Diagnose auf eosinophile Zellen nicht die Färbbarkeit der Körner in einem der sauren Farbstoffe, sondern es ist der Nachweis der Chromophilie zu sämmtlichen sauren Farben erforderlich. Es ist aber die Diagnose gesichert bei der Anwendung folgender Färbeflüssigkeiten:

a) stark rothes Eosin-Glyzerin,
b) gesättigtes Indulin-Glyzerin,
c) gesättigte wässerige Orangelösung,
d) Eosin-Indulin-Glyzerin.

B) Basophile Granulationen, die sich mit den gewöhnlichen basischen Anilinfarben (bakterienfärbende: Methylenblau, Gentianaviolett, Fuchsin, Bismarckbraun etc.) färben. Es gehören unter diese Gruppe die $\gamma$-Granulationen und die $\delta$-Granulationen. Die $\gamma$-Granulationen werden auch als Mastzellenkörnung bezeichnet. Sie kommen im normalen menschlichen Blute nicht vor, wohl aber sehr zahlreich im leukämischen. Die $\delta$-Granulationen, die ebenfalls mit basischen Anilinfarben tingirbar sind, finden sich in den mononucleären Uebergangsformen des menschlichen Blutes.

Die basophilen $\gamma$-Granulationen sind grobkörnig, die $\delta$-Granulationen feiner.

Ehrlich empfiehlt zur Darstellung der $\gamma$-Granulationen folgende Lösung:

| | |
|---|---|
| Alkohol absolut. | 50,0 |
| Aqu. | 100,0 |
| Acid. acetic. glacial. | 12,5 |

Dahlia, bis zur fast vollständigen Sättigung.

Färbung mehrere Stunden, Abspülen, langes Ausziehen in Alkohol.

Zum Nachweis in Organen ist Alkoholhärtung nothwendig, Färben 12 Stunden lang, Ausziehen in Alkohol.

Westphal bedient sich zur gleichzeitigen Kernfärbung folgender Lösung:

| | |
|---|---|
| Grenacher's Karmin (Karmin pur. 2,0 — Aqu. destillat. 200,0 — Alumin. 5,0 gekocht, filtrirt und Acid. carbolic. 1,0 zugesetzt) | 100 ccm |
| Glyzerin | 100 „ |
| Stark Dahliahaltiger Alkohol absolut. | 100 „ |
| Acid. acetic. glacial. | 20 „ |

Abspülen des gefärbten Deckglases, Lufttrocken werden lassen, Einschluss in Kanadabalsam.

Die Mastzellen erscheinen als rothviolette Körnerhaufen, deren jeder in seiner Mitte einen Zellenkernfleck trägt. Sämmtliche übrigen Kerngebilde sind violett oder blau.

Nach demselben Autor färbt unreines Methylengrün sehr distinct die $\gamma$-Körner blau-violett, die Kerne grün.

Die $\delta$-Granulationen färbt man 10 Minuten lang in concentrirter wässeriger Methylenblaulösung, Abspülen in Wasser, Trocknen, Kanadabalsam.

C) Darstellung der neutrophilen Granulationen = $\varepsilon$-Granulationen.

Dieselben färben sich mit neutralen Anilinfarben, d. h. solchen, die durch Vermischung einer basischen mit einer sauren Anilinfarbe entstanden sind. Sie sind dichtgedrängt in den polynucleären Leuko-

cyten vorhanden. Ausserdem finden sie sich in sämmtlichen mononucleären Leukocyten des myelämischen Blutes.

Darstellung.

1) Herstellung eines Deckglastrockenpräparates nach der Methode von Ehrlich.

2) Färbung mehrere Minuten in einer Mischung von:

| | |
|---|---|
| Gesättigte wässerige Orangelösung | 125 |
| Concentrirte wässerige Säurefuchsinlösung mit 20 Proc. Alkoholgehalt | 125 |
| werden gemischt, dann noch zugesetzt | |
| Alkohol absolut. | 75 |
| Gesättigte wässerige Methylgrünlösung | 125. |

Die Lösung ist erst nach längerem Stehen verwendbar. Da durch das Filtriren Veränderungen in der Zusammensetzung und ausserdem Bildung eines Niederschlags bewirkt werden würde, so verfährt man zur Färbung so, dass man mit einer Pipette aus der Mitte der Flüssigkeit etwas entnimmt und auf das Deckglas bringt.

3) Abwaschen in Wasser. Kanadabalsam.

Es erscheint dann das Hämoglobin orangegelb, die Kerne grünlich, die eosinophile Körnung tief dunkelgrau, die neutrophile Körnung intensiv violett.

Sehr scharfe Bilder giebt auch folgende Methode:

1) Färben 5 Minuten lang in einer Lösung von:

| | |
|---|---|
| Gesättigte wässerige Säurefuchsinlösung | 5 Vol. |
| unter Umschütteln allmählich zugesetzt: | |
| Concentrirte wässerige Methylenblaulösung | 1 „ |
| Aqu. destillat. | 5 „ |

2) Oberflächliches Abspülen in Wasser, Absaugen des Wassers mit Fliesspapier, Lufttrocknen, Kanadabalsam.

Die Erythrocyten sind roth, die $\varepsilon$-Körnung violett.

Sehr gute Resultate giebt auch das Aronson-Philipp'sche Gemisch:

Orange G
Säurerubin extra } gesättigte wässerige Lösungen.
Kryst. Methylgrün

Von den durch Sedimentiren geklärten Lösungen mischt man:

| | |
|---|---|
| Orange G. | 55 ccm |
| Säurerubin | 50 „ |
| Aqu. destillat | 100 „ |
| Alkohol | 50 „ |
| Methylgrün | 65 „ |
| Aqu. destillat. | 50 „ |
| Alkohol | 12 „ |

Die Lösung muss mehrere Wochen stehen. Färben mehrere Stunden lang. Abspülen in Wasser, Lufttrocknen, Kanadabalsam. Die Kerne sind grün, Hämoglobin orange, $\varepsilon$-Körnung violettroth, $\alpha$-Körnung gelbroth.

Von besonderer Wichtigkeit ist, dass diese neutrophile Körnung = $\varepsilon$-Körnung den sogen. polynucleären Leukocyten angehört, also denjenigen Formen, welche bei der Entzündung emigriren. Dieselben machen den Hauptbestandtheil der weissen Blutkörperchen im normalen Blut aus; der Eiter besteht der Hauptsache nach aus diesen Leukocyten mit neutrophilen Granulationen.

Eine neuerdings von Ehrlich empfohlene Farbmischung hat folgende Zusammensetzung: Orange 5, gesättigte wässerige Lösung = 120,0 g. — Säurefuchsin, gesättigte wässerige Lösung = 80,0 g. — Methylgrün, gesättigte wässerige Lösung = 100,0 g. — Aqu. destillat. = 300 g. — Alkohol absolut 180,0 g. — Glyzerin 50,0. Nicht umzuschütteln! Es färben sich die $\alpha$,-$\varepsilon$- und $\beta$-Granulationen.

### III. Untersuchung des Blutes in Schnitten nach Biondi.

Zur Untersuchung des vorher fixirten Blutes in einer Art von Schnittpräparaten hat Biondi eine Methode angegeben, die sich auch für andere flüssige Gewebsbestandtheile eignet.

Einige Tropfen Blut werden in 5 ccm einer 2-proc. Osmiumsäurelösung gebracht und in derselben durch Umschütteln vertheilt. Später senken sich die zelligen Elemente zu Boden. Nach 24 Stunden (nicht länger!) entnimmt man mit der Pipette 1—2 Tropfen der Osmiumsäurelösung und überträgt sie in 5 ccm Agar-Agar (Agar nach Biondi, zu beziehen von Herrn König, Berlin, Dorotheenstrasse 29), welches bei 33 °—37 ° verflüssigt wird. In demselben wird das Blutosmiumsäuregemisch wieder durch Schütteln vertheilt, dann wird das Agar in Papierkästchen ausgegossen, wo es rasch erstarrt. Nun wird der Agarblock in 85-proc., mehrmals zu wechselndem Spiritus gehärtet und geschnitten, eventuell zwischen Hollundermark. Färbungen lassen sich sehr gut anwenden, daselbst intensive Anilinfärbungen von dem Agar in Alkohol wieder abgegeben werden. Zum Aufhellen der Schnitte ist Xylol zu vermeiden. Die ätherischen Oele sowie Kreosot sind dagegen anwendbar.

Noch feinere Schnitte erhält man nach Biondi durch eine Combination der Agareinbettung mit Paraffindurchtränkung. Der das Blut enthaltende Agarblock wird für einen Tag in Bergamottöl gebracht, kommt aus diesem direct für 1—2 Stunden in Paraffin von 45°, dann lässt man ihn in Papierkästchen in Wasser erstarren. Vor der Färbung Entfernung des Paraffins. Aehnliche Resultate erreicht man mit den Methoden von Rindfleisch und H. F. Müller.

Nach Rindfleisch wird das in irgend einer Weise fixirte Blut ausgewaschen, mit einer ganz geringen Menge Glyzerin vermischt und dann auf Glasplatten an staubfreiem Orte dem Trocknen überlassen, soweit dies der Glyzerinzusatz gestattet. Dann wird dasselbe mit einer ganz dünnen Lage von Celloidin übergossen, die sich nach dem Verdunsten als feines Häutchen anziehen lässt. Das Häutchen wird gefärbt etc.

H. F. Müller stellt von Blut, dann aber auch von anderen Substanzen, die nicht fest am Deckglas haften, Deckglastrockenpräparate her, bringt die Deckgläschen für einen Moment auf eine ganz dünne Celloidinlösung, lässt abtropfen und lufttrocknen. Darauf kann in der gewöhnlichen Weise nach Ehrlich gefärbt werden.

### Untersuchung der Blutplättchen.

Die Blutplättchen sind flache, ovale Scheiben, die in ihrer Grösse schwanken und ein Drittel der Grösse eines rothen Blutkörperchens erreichen können.

Bei ihrer Darstellung muss man berücksichtigen, dass sie auf den geringsten Reiz, auch den der Luft, sehr erhebliche Gestalts- und Formveränderungen eingehen.

Man verfährt deshalb so, dass man auf die eigene Haut oder auf die Haut des rasirten Warmblüters einen grossen Tropfen 1-proc. Osmiumsäure bringt und durch diesen hindurch die Haut ansticht. In dem Blut, welches sich dann ohne mit der Luft in Berührung zu kommen, in der Osmiumsäure vertheilt, kann man die Blutplättchen gut untersuchen.

Statt der, namentlich von Eberth und Schimmelbusch empfohlenen Osmiumsäure kann man sich auch einer Lösung bedienen von

Methylviolett 0,01
0,6-proc. Kochsalzlösung 50,0

Ein weiteres Mittel zur Veranschaulichung der Blutplättchen besteht in der sehr schnell vorgenommenen Erhitzung eines Trockenpräparates nach Ehrlich (s. p. 90).

Die Blutkörperchen färben sich in Trockenpräparaten in concentrirten wässerigen Lösungen von Methylviolett, Anilingrün, Fuchsin diffus. Haben sie sich aber schon, was meistens geschieht, in einen centralen körnigen Theil und eine homogene periphere Partie differenzirt, so färbt sich das Centrum etwas intensiver.

## Untersuchung und Nachweis von Fibrin.

Zur Untersuchung des Fibrins genügt sehr oft eine Doppelfärbung mit Hämatoxylin und Eosin an möglichst dünnen Schnitten. Auf diese Weise gelingt es z. B. ganz gut, das Fibrinnetz bei der fibrinösen Pneumonie und innerhalb der diphtherisch entzündeten Schleimhäute sichtbar zu machen.

Eine vorzügliche Methode zur Untersuchung und Färbung des Fibrins ist die von Weigert angegebene, die sich von der Bakterienfärbung desselben Autors (s. p. 63) nur in der Wahl der Entfärbungsflüssigkeit unterscheidet.

Weigert'sche Fibrinfärbungsmethode.

1) Alkoholhärtung.
2) Färbung 5—15 Minuten lang in concentrirter Anilinwassergentianaviolettlösung.
3) Abspülen in 0,6 Proc. NaCl-Lösung.
4) Abtrocknen auf dem Spatel oder Objectträger mit Fliesspapier.
5) 2—3 Minuten auf dem Objectträger oder Spatel in Jodjodkalilösung 1:2:100.
6) Abtrocknen mit Fliesspapier.
7) Entfärben in
   Anilinöl 2 Thl.
   Xylol 1 „
8) Entfernen des Anilin-Xylols durch Xylol.
9) Kanadabalsam.

Auf diese Weise wird das Fibrin schön blau gefärbt, während alles Andere ausgenommen Bakterien, entfärbt wird. Nicht gefärbt werden namentlich auch Blutkörperchenreste, käsige Massen und Coagulationsnekrosen.

Eine schöne Doppelfärbung lässt sich erzielen, wenn man die Präparate mit Lithionkarmin (s. p. 36) vorfärbt.

Man kann nach Löwit die Fibrinfärbung auch am frischen Blutpräparat vornehmen. Man wartet den Eintritt der Gerinnung unter dem Deckglas ab und zieht dann zunächst vom Rande des Deckglases

her eine 0,6-proc. Kochsalzlösung durch, bis die rothen Blutkörperchen ausgeschwemmt sind. Die Leukocyten und Blutplättchen bleiben meist zurück. Dann folgen Alkoholdurchspülung und die einzelnen Proceduren der Weigert'schen Methode, die sämmtlich unter dem Deckglas vorgenommen werden.

Zenker empfiehlt die Anilinwassergentianaviolettlösung nicht durch Zugiessen alkoholischer Farblösung, sondern durch directes Auflösen der Farbe in Anilinwasser herzustellen, weil dann die Farbe weniger leicht ausgezogen werden soll. Auch verlängert er die Entfärbungszeit dadurch, dass er 1 Theil Anilinöl mit 2 Theilen Xylol mischt.

### Modification der Fibrinfärbung nach Beneke.

Wenn man die entfärbende Fähigkeit des Anilinölxylols durch stärkeren Zusatz von Xylol herabsetzt, so kann man auch eine Reihe anderer Gebilde mit der Fibrinfärbungsmethode darstellen. Beneke empfiehlt zu diesem Zweck 2 Theile Anilinöl mit 3 Theilen Xylol zu mischen. Man kann auf diese Weise darstellen: 1) Kerntheilungsfiguren, 2) Bindegewebsfasern, blauviolett bis röthlichviolett, 3) Elastisches Gewebe, leuchtend roth, und dadurch von den dunkelblauen Bindegewebsfibrillen scharf abgehoben, 4) Fibrillen des Knochengewebes und Sharpey'sche Fasern, 5) Quergestreifte Musculatur mit deutlicher Abhebung der dunkelblauen Querscheiben, 6) Neuroglia. Ausser dieser färben sich im Centralnervensystem nur noch die Kerne der Ganglienzellen, 7) die Epithelfibrillen des Plattenepithels.

Der Grad der nöthigen Entfärbung ist für die einzelnen aufgezählten Gewebe ein verschiedener und muss eventuell dadurch controllirt werden, dass man den Schnitt probeweise in reines Xylol bringt und unter dem Mikroskop untersucht.

## Fremde Bestandtheile im Blut.

Zur Untersuchung des Blutes auf Pigment genügt eine einfache Vertheilung feinster Bluttröpfchen in einem Tropfen 0,6-proc. Kochsalzlösung.

Ausserdem kann man Trockenpräparate ungefärbt oder mit Anilinfarben gefärbt herstellen.

Von Schizomyceten kommen im Blute des lebenden Menschen hauptsächlich Milzbrandbacillen und Recurrensspirillen vor. Auf Milzbrandbacillen untersucht man Deckglastrockenpräparate, die nach Gram gefärbt sind, oder Blutstropfen frisch. Bei Thieren, die mit Milzbrand inficirt sind, kann man das Blut auch sehr gut im hängenden Tropfen untersuchen.

Will man auf andere Mikroorganismen, speciell auf Kokken, untersuchen, so muss man sich vor allem vor einer Verwechslung mit den basophilen $\gamma$- und $\delta$-Granulationen (s. p. 92) hüten, die sich ebenso wie die Bakterien mit den basischen Anilinfarben tingiren. Die $\delta$-Granulationen sind so fein, dass sie mit den bekannten Kokkenformen nicht verwechselt werden können. Die Körner der Mastzellengranulationen können dagegen den Kokken sehr ähnlich sein, sind aber gewöhnlich nicht so gleichmässig gross wie die letzteren.

Man kann sich die Bakterienfärbung von Bluttrockenpräparaten sehr erleichtern, wenn man dieselben 10 Secunden lang mit 1-proc. bis 5-proc. Essigsäure behandelt, danach gründlich auswäscht und nun färbt.

Auf diese Weise wird das Hämoglobin aus den rothen Blutkörperchen ausgezogen, und die Bakterien werden fast isolirt gefärbt.

Recurrensspirillen können während des Fieberanfalls im frischen Blut untersucht werden. Sie sind an ihrer lebhaften Eigenbewegung zu erkennen. In Trockenpräparaten Färbung mit Bismarckbraun in wässeriger oder in Glyzerinlösung oder mit Löffler's Methylenblau. S. ausserdem p. 82.

## Zählung der Blutkörperchen.

Zur Zählung der Blutkörperchen bedarf es einer vorherigen Verdünnung des Blutes. Man bedient sich dazu einer Pipette, welche in ihrer Mitte eine ampullenartige Erweiterung trägt. Diese Ampulle hat genau den 100fachen Cubikinhalt von demjenigen Theil der Pipette, der unterhalb der Ampulle gelegen ist. Man verfährt nun so, dass man zunächst die Pipette bis an die Grenze der Ampulle mit Blut füllt und dann so viel von der Verdünnungsflüssigkeit nachzieht, dass die Ampulle gerade gefüllt wird. Auf diese Weise erreicht man eine 100fache Verdünnung.

Es sind verschiedene Verdünnungsflüssigkeiten angegeben worden. Am leichtesten gelingt die Untersuchung mit der

Verdünnungsflüssigkeit von Toison:

| | |
|---|---|
| Methylviolett | 0,025 |
| Neutr. Glyzerin | 30 ccm |
| Aqu. destillat. | 80,0. |

Dazu kommt eine Lösung von

| | |
|---|---|
| Chlornatrium | 1,0 |
| Schwefelsaures Natr. | 8,0 |
| Aqu. destill. | 80,0. |

Dann wird filtrirt.

Nach 5—10 Minuten sind die weissen Blutkörperchen violett tingirt und unterscheiden sich alle gut von den grünlich gefärbten rothen Blutkörperchen.

Mit dem durch diese Flüssigkeit auf das 100fache verdünnten Blute füllt man nun den Thoma-Zeiss'schen Zählapparat (zu beziehen von K. Zeiss, Jena). Derselbe besteht aus einer 0,1 mm tiefen feuchten Kammer, deren Boden in 400 Quadrate eingetheilt ist, so dass die Flüssigkeitsschicht, die sich über einem solchen Quadrate befindet, $= \frac{1}{4000}$ ccm beträgt.

Es werden dann in möglichst vielen Quadraten die Blutkörperchen gezählt, und zwar nicht nur diejenigen, die sich im Quadratraum selbst befinden, sondern auch diejenigen, welche auf den Linien des Quadrats liegen. Zur Berechnung multiplicirt man den Cubikinhalt 4000 mit der Zahl der Verdünnung und mit der Zahl der gezählten Blutkörperchen und dividirt durch die Anzahl der gezählten Felder. Die Zahl, die man erhält, ergiebt die Zahl der Blutkörperchen in einem Cubikmillimeter. In einer Formel ausgedrückt, ist die Berechnung folgende:

$$x = \frac{4000 \,.\, v \,.\, z}{n}$$

$x$ = Zahl der Blutkörperchen in einem Cubikmillimeter unverdünnten Bluts, $v$ = Verdünnung, in den meisten Fällen also = 100, $z$ die

Zahl der Blutkörperchen in den Quadraten. $n$ = Anzahl der gezählten Felder.

Will man bloss die weissen Blutkörperchen zählen, so kann man nach dem Vorgang von THOMA das Blut im Verhältniss 1:10 mit Wasser verdünnen, welches 0,3 Proc. Essigsäureanhydrid enthält. Die rothen Blutkörperchen werden dann gelöst, und dadurch das Zählen der weissen sehr erleichtert.

## Untersuchung des Herzens und der Gefässe.

Der Zustand des Herzmuskels lässt sich sehr gut an frischen Zupfpräparaten untersuchen, bei denen die Zerzupfung nur hinreichend fein ausgeführt werden muss. Zur Unterscheidung der trüben Schwellung von der Verfettung bedient man sich der in Cap. 1 (p. 8 und 9) angegebenen Reagentien, Essigsäure einerseits und andererseits 1-proc. Osmiumsäure (s. auch p. 48).

Pigmentdegeneration des Herzmuskels erkennt man ebenfalls gut an Zupfpräparaten.

Die Härtung geschieht vorzugsweise in MÜLLER'scher Flüssigkeit, dann auch in Alkohol.

Schnittpräparate bettet man zweckmässig in Celloidin ein und färbt mit Kernfärbemitteln. Die Karminfärbungen, Lithionkarmin und Boraxkarmin, verdienen namentlich dann den Vorzug, wenn es sich um Pigment handelt. Pikrokarmin lässt die quergestreiften Muskelfasern sehr deutlich hervortreten.

Endocarditische Efflorescenzen und Klappenvegetationen kann man frisch auf Bakterien an Deckglastrockenpräparaten untersuchen, die man so herstellt, dass man die Auflagerungsmassen direct auf Deckgläsern abreibt, oder auch so, dass man sie in etwas sterilisirtem Wasser vermittels eines ausgeglühten Glasstabes verreibt und von der Flüssigkeit auf Deckgläser aufstreicht.

Schnittpräparate sind in Celloidin einzubetten. Auch Paraffineinbettung kann angewandt werden.

Zur Färbung dient entweder die einfache Tinction mit Gentianaviolett und Auswaschen in Alkohol (cf. p. 62) oder die GRAM'sche Methode, nach der sich die meisten in den endocarditischen Auflagerungen vorkommenden Bakterien, so namentlich der Streptococcus und Staphylococcus pyogenes, sowie der FRÄNKEL-WEICHSELBAUM'sche Pneumococcus färben.

Zur histologischen Untersuchung der endocarditischen Efflorescenzen färbt man mit Alaunkarmin oder mit Hämatoxylin und Karmin resp. Eosin; oft ist auch die WEIGERT'sche Fibrinfärbung (p. 95) am Platz.

Die grossen Gefässe härtet man ebenfalls am zweckmässigsten in MÜLLER'scher Flüssigkeit. Zur Darstellung der elastischen Fasern dienen die p. 99 angegebenen Methoden.

## Milz, Knochenmark und Lymphdrüsen.

Als Härtungsmittel sind zu empfehlen in erster Linie MÜLLER'sche Flüssigkeit, dann auch Sublimat. Mit Vortheil kann man sich nach dem Vorgang von FOÀ auch einer Lösung von 2 g Sublimat in 100 g fast zum Sieden erhitzter MÜLLER'scher Füssigkeit bedienen. Ebenso ist die ZENKER'sche Härtungsflüssigkeit (s. p. 11) empfehlenswerth. Mitunter ist auch die Anwendung von Formalin (s. p. 12) am Platze. Zur

Färbung dienen die Kernfärbemittel, daneben kommen aber auch die von Ehrlich für die Blutuntersuchung angegebenen Färbungen (s. p. 91) in Betracht.

Knochenmark gewinnt man derart, dass man einen langen Röhrenknochen aufmeisselt oder mit einer Knochenscheere eröffnet und mit dem Skalpell einen Würfel entnimmt. Härtung in den oben empfohlenen Fixirungsflüssigkeiten. Färbung mit den für das Blut angegebenen Methoden.

Man kann aber auch die Knochenmarksflüssigkeit nach der Deckglastrockenmethode untersuchen (s. Blut), indem man einen markhaltigen, namentlich spongiösen Knochen auf dem Schraubstock auspresst.

Schliesslich kann man auch die Markhöhle anbohren, ein feines Capillarröhrchen einstossen und den in dem Röhrchen aufsteigenden Marksaft auf das Deckglas bringen.

Um Milzpulpa ganz frisch zu untersuchen, empfiehlt Ehrlich, sofort nach dem Tode mit einem dicken Troicart durch die Haut durch in die Milz einzustechen und den so erhaltenen Saft auf dem Deckglas auszustreichen.

## Seröse Häute.

Für dieselben kommen die Härtungen in Müller'scher Flüssigkeit oder Alkohol und als Färbung die gewöhnlichen Kernfärbemittel zur Anwendung.

Seröse Trans- und Exsudate kann man, wenn sie zellreich sind, direct im frischen Präparat mit Zusatz von etwas Kochsalzlösung untersuchen. Sind sie dagegen zellarm, so lässt man sie sedimentiren, was sich namentlich auch dann empfiehlt, wenn man auf Tuberkelbacillen oder andere Bakterien untersuchen will, oder man wendet das Centrifugirungsverfahren an.

## Haut.

Die Haut wird in Müller'scher Flüssigkeit oder in Alkohol gehärtet und passend in Celloidin eingebettet. Zur Färbung dient Alaunkarmin oder eine andere Kernfärbung.

Für die Darstellung der elastischen Fasern in der Haut hat Unna folgende Vorschrift gegeben:

1) Härtung in absolutem Alkohol oder in Flemming'scher Lösung mit Nachhärtung in absolutem Alkohol.
2) Vorfärbung (eventuell) in Vesuvin.
3) Auswaschen.
4) Färbung 24 Stunden lang in:

| | | |
|---|---|---|
| Fuchsin | | 0,5 |
| Aqu. destillat. | ana | 25,0 |
| Alkohol | | |
| Acid. nitric. (25-proc.) | | 10,0. |

5) 2—3 Secunden in 25-proc. Salpetersäure.
6) Entfärben in schwachem Essigwasser.
7) Rasche Entwässerung in absolutem Alkohol, Cedernöl, Kanadabalsam.

Herxheimer hat zur Darstellung der elastischen Fasern in der Haut folgendes Verfahren angegeben:

1) Härtung in Müller'scher Flüssigkeit.
2) Färbung 3—5 Minuten lang in:

| | |
|---|---|
| Hämatoxylin | 1,0 |
| Alkohol abs. | 20,0 |
| Wasser | 20,0 |
| Kalt gesättigte Lithion carbonicum-Lösung | 1,0. |

3) Extraction 5—20 Secunden lang in officineller Lösung von Eisenchlorid.
4) Abspülen in Wasser.
5) Alkohol, Oel, Kanadabalsam.

Die elastischen Fasern werden blauschwarz bis tiefschwarz; das umgebende Gewebe hellblau bis bläulich. Die Kerne des Bindegewebes und Rundzellen erscheinen ebenfalls noch gefärbt. Nachfärbung mit Bismarckbraun ist möglich.

Die Methode gelingt nur bei Färbung einzelner Schnitte, nicht ganzer Stückchen. Härtung in absolutem Alkohol, in Pikrinsäure und in Flemming'schem Gemisch ist ebenfalls zulässig, Müller'sche Flüssigkeit ist aber vorzuziehen, weil sich namentlich die Entfärbung leichter vollzieht.

Manchot hat zur Darstellung der elastischen Fasern folgendes Verfahren empfohlen:

1) Härtung in Müller'scher Füssigkeit oder in Alkohol.
2) Färben der Schnitte $^1/_2$ Minute lang in concentrirter wässeriger Fuchsinlösung.
3) Abspülen des überschüssigen Farbstoffs in Wasser.
4) Entfärben 1—12 Stunden lang in wässeriger Zuckerlösung von der Consistenz und dem Flüssigkeitsgrade des Glyzerins, welcher auf je 10 ccm 3—4 Tropfen gewöhnlicher Schwefelsäure zugesetzt sind.
5) Einschluss der Schnitte in nicht angesäuerter Zuckerlösung.

Celloidin muss vor der Färbung aus den Schnitten entfernt werden.

Sehr brauchbar ist das Verfahren von Unna-Taenzer:

1) Härtung am besten in Alkohol, doch gelingt die Methode auch bei Härtung in Müller'scher Flüssigkeit.
2) Färben 6—12—24 Stunden lang in einer Lösung von:

| | |
|---|---|
| Orcein | 0,5 |
| Alkohol absol. | 40,0 |
| Aqu. destillat. | 20,0 |
| Acid. hydrochlor. gutt. | 20. |

3) Entfärben in einer Lösung von:

| | |
|---|---|
| Acid. hydrochlor. conc. | 0,1 |
| 95-proc. Spiritus | 20,0 |
| Aqu. destillat. | 5,0. |

Elastische Substanz braunroth, Hornsubstanz braunroth, alle übrigen Theile der Haut nur schwach, aber deutlich tingirt. Man kann Vorfärbung mit Boraxkarmin vornehmen.

Beneke empfiehlt seine modificirte Fibrinfärbungsmethode (s. p. 96) für Darstellung der elastischen Fasern. Dieselben heben sich durch ihre leuchtend rothe Farbe von dem violetten Bindegewebe ab.

Färbung des kollagenen Gewebes nach Unna.

1) Alkoholhärtung. Färbung 5—10 Minuten lang in 2-proc. wässeriger Säurefuchsinlösung.

2) Abspülen in Wasser.
3) Uebertragen für 1—2 Minuten in gesättigte wässerige Pikrinsäurelösung, Entwässern in pikrinsäurehaltigem absolutem Alkohol, Abspülen in absolutem Alkohol, Oel, Kanadabalsam.

Eine zweite Methode desselben Autors ist folgende:

1) Färben 20 Sekunden lang in 1-proc. wässeriger Lösung von Wasserblau.
2) Abspülen in Wasser.
3) Färben 5 Minuten lang in neutraler wässeriger Saffraninlösung.
4) Abspülen in Wasser. Alkohol absolut. Bergamottöl. Kanadabalsam.

Kollagene Substanz himmelblau, Kerne roth, protoplasmatische Theile violett, Hornschicht dunkelroth.

Auch die von Beneke angegebene Modifikation der Fibrinfärbungsmethode ist nach Unna sehr gut geeignet.

Darstellung der Plasma- und Mastzellen nach Unna.

1) Alkoholhärtung. Färben, eventuell in erwärmter Lösung von:

| | |
|---|---|
| Methylenblau | 1,0 |
| Kali caust. | 0,05 |
| Aqu. | 100,0 |

2) Entfärbung in Creosol.
3) Trocknen zwischen Fliesspapier oder rasche Entwässerung in absolutem Alkohol.

Wenn man in absolutem Alkohol entwässern will, so muss man die Schnitte etwas stärker färben und sie aus dem Alkohol entfernen, wenn die Oberhaut sich als dunkler Streifen von der Cutis abhebt.

Eine weitere, sehr gute Methode von Unna ist folgende:

Die Schnitte der in Alkohol gehärteten Präparate werden in altem basischem Methylenblau, welches methylenviolett- und methylenrothhaltig ist, überfärbt, $^1/_4$—12 Stunden lang. Dann Abspülen in Wasser und Differenziren in Unna'scher Glyzerin-Aetherlösung (von Dr. Grübler, Leipzig, zu beziehen), gewöhnlich $^1/_4$ Minute lang, sorgfältiges Abspülen in Wasser, Alkohol, Bergamottöl, Kanadabalsam.

Die Darstellung der epiphytischen Bakterien, die sich auf der Haut befinden, erfordert eine besondere Technik, weil die Hornsubstanzen eine ähnliche Affinität zu den basischen Anilinfarben besitzen, wie die Bakterien, und daher leicht zu stark mitgefärbt, resp. zu wenig entfärbt werden, oder gleichzeitig eine zu starke Entfärbung der Bakterien eintritt.

Vor der Färbung müssen die Hautschuppen entfettet werden. Man kann dabei in verschiedener Weise verfahren.

1) Man wäscht die Hautschuppen in Aether und Alkohol aus, färbt sie dann in alkoholischer Eosinlösung und untersucht sie (eventuell auch ohne vorherige Färbung) in 33-proc. Kalilauge.

2) Man entfettet die Schüppchen oder die Haut in Alkohol und Aether, färbt sie in Anilinwasserfuchsin, wäscht sie in salzsaurem Alkohol aus, entwässert in Alkohol und untersucht in Kanadabalsam. Man kann auch eine Doppelfärbung mit Genitianaviolett anfügen.

3) Man tupft nach Bizzozero Deckgläser auf die zu untersuchende Stelle der Oberhaut, zieht dann die Deckgläser dreimal durch die Flamme und entfettet nun in Alkohol und Aether.

Alsdann wird mit einer Anilinfarbe gefärbt.

Nach vorheriger Entfettung untersucht man dann die Schuppen in folgender Weise:

a) Man bringt sie aus dem Alkohol in einen Tropfen 50-proc. Essigsäure oder 10-proc. Kalilauge; nachdem die Schüppchen aufgequollen sind, legt man ein Deckglas auf und untersucht; noch empfehlenswerther ist es oft, die Schüppchen auf dem Deckglas in Essigsäure aufquellen zu lassen, die Essigsäure zu verdampfen und nun das Präparat wie ein Deckglastrockenpräparat zu behandeln und mit Löffler'schem Methylenblau zu färben.

b) Man kann die Schüppchen auch in Glyzerin untersuchen, welches durch Methylenblau gefärbt ist. Die Bakterien nehmen eine blaue Farbe an.

Boeck hat zum Nachweis von Schimmelpilzen in Epidermisschüppchen folgendes Verfahren angegeben:

1) Entfettung der Schüppchen in Alkohol und Aether.
2) Färbung ½ bis einige Minuten lang in
   Sahli's Methylenblaulösung =
   5-proc. wässerige Boraxlösung 16 Theile
   concentrirte wässerige Methylenblaulösung 20 „
   Wasser 24 „
3) Uebertragen für ½—1 Minute in schwache, wässerige Resorcinlösung (einige Körnchen Resorcin in einer Uhrschale mit Wasser).
4) Uebertragen in Alkohol einige Minuten bis 1 Stunde.
5) Entfärbung in schwacher Lösung von Wasserstoffsuperoxyd. (Diese Entfärbung ist nicht immer, aber oft nöthig.)
6) Alkohol. Xylol. Kanadabalsam.

Unna (Monatshefte f. praktische Dermatol. XIII, No. 6 u. 7) empfiehlt folgendes Verfahren zum Nachweis von Bakterien: Man zerreibt die mit einem Tropfen Eisessig angefeuchteten Hautschuppen zwischen zwei Objectträgern zu einem Brei, trocknet die von einander gehobenen Objectträger rasch über der Flamme und giesst dann auf die schräg gehaltenen Objectträger Alkohol-Aether zur Entfernung des Fettes. Färben mit Borax-Methylenblau, Abspülen mit Wasser. Will man stärker entfärben, so wendet man eines der von Unna a. a. O. empfohlenen Reagentien an.

## Schleimhäute.

Härtung in Müller'scher Flüssigkeit; wenn es auf die Untersuchung des Epithels ankommt, so muss man das Material möglichst frisch in die Härtungsflüssigkeit bringen und vor dem Schneiden in Celloidin einbetten. Celloidineinbettung ist auch nöthig, wenn man Auflagerungen, mit denen die Schleimhaut bedeckt ist, untersuchen will.

Färbung mit den gewöhnlichen Kernfärbungsmitteln, Doppelfärbung mit Hämatoxylin und Eosin.

## Darm.

Zur Härtung dient hauptsächlich Müller'sche Flüssigkeit, dann auch Sublimat und nach der Empfehlung von Heidenhain Pikrinsäure. Auch bei der Magen- und Darmschleimhaut kommt es für feine Untersuchungen darauf an, dass man die zu untersuchenden Stücke möglichst bald in die Conservirungsflüssigkeit bringt. Beim Magen kann man

dieser Forderung dadurch gerecht werden, dass man denselben bald nach dem Tode in der Leiche durch ein Gummirohr mit Müller'scher Flüssigkeit füllt.

Zur Anfertigung von Schnittpräparaten ist immer Celloidineinbettung zu empfehlen.

Als Färbemittel dienen die gewöhnlichen Kernfärbungen, auch Doppelfärbung mit Hämatoxylin und Eosin. Für manche Verhältnisse eignet sich sehr gut die von Heidenhain empfohlene Färbung mit der Biondi-Heidenhain'schen Flüssigkeit (s. p. 39).

Zur frischen Untersuchung des Magen- und Darminhalts ist es meist geboten, denselben in hinreichender Verdünnung unter das Mikroskop zu bringen. Man verfährt so, dass man mit einer feinen Platinöse eine minimale Menge von Darminhalt in einem Tropfen Wasser oder Kochsalzlösung auf dem Objectträger vertheilt. Zur Trennung der verschiedenen Bestandtheile der Faeces bedient man sich passend der Centrifuge.

Wenn der Magen- oder Darminhalt Blut beigemengt enthält, so sind oft in der schwarzen Masse wenigstens noch einzelne rothe Blutkörperchen zu erkennen, welche die Diagnose sichern. Andernfalls muss man die Häminprobe anstellen (s. p. 126).

Zum Nachweis sonstiger zelliger Bestandtheile, Speisereste etc. bedarf es keiner besonderen Kunstgriffe. Amylumkörner werden durch die Jodreaction nachgewiesen (cf. p. 50). Zur Untersuchung auf Bakterien stellt man Deckglastrockenpräparate her. Als Färbemittel eignen sich für den Mageninhalt Vesuvin, welches die Sarcine und die verschiedenen Hefearten am deutlichsten färbt, für den Darminhalt die gebräuchlichen Lösungen von Anilinfarben. Auch bei der Untersuchung auf Bakterien muss der Darminhalt stark mit sterilisirtem Wasser verdünnt werden.

Zu bemerken ist, dass im Darminhalt eine Reihe von Bakterien vorkommen, die sich mit Jodjodkaliumlösung blau färben.

Will man den Darminhalt auf Cholerabakterien untersuchen, so kann man direct Deckglastrockenpräparate färben. Besser aber ist das von Schottelius empfohlene Verfahren, den Darminhalt mit der gleichen Menge alkalischer Bouillon zu verdünnen und offen stehen zu lassen. Die Cholerabacillen entwickeln sich hauptsächlich an der Oberfläche, so dass Präparate, die von da entnommen sind, immer reichlich Kommabacillen enthalten.

## Leber und Pankreas.

Leber und Pankreas werden am besten in Müller'scher Flüssigkeit gehärtet. Zum Nachweis degenerativer Veränderungen untersucht man die Leberzellen frisch in Abstrichpräparaten und setzt Essigsäure oder Osmiumsäure zu.

Zur Härtung wählt man, wenn es auf die Untersuchung degenerativer Veränderungen ankommt, Flemming'sche Lösung (cf. p. 43 u. 48) oder die Marchi'sche Mischung (s. p. 107).

In Müller'scher Flüssigkeit gehärtete Präparate werden mit Alaunkarmin oder Hämatoxylin gefärbt; eventuell Doppelfärbungen mit Hämatoxylin und Eosin.

Zur Conservirung des Gallenfarbstoffes bewährt sich besonders gut Sublimathärtung. Auch Formalin kann angewandt werden.

Tumoren bettet man am besten in Celloidin ein, da ihr Gewebe oft sehr leicht im Schnittpräparat ausfällt.

Darstellung der Gallencapillaren nach Böhm.

1) Härtung höchstens 1 ccm grosser Leberstückchen, 72 Stunden lang, in einer Mischung von
   3-proc. Kali bichromicum-Lösung 4 Volum.
   1-proc. Ueberosmiumsäure 1 „
2) Uebertragen für 24—48 Stunden in 0,75-proc. Argentum nitricum-Lösung.
3) Auswaschen in destillirtem Wasser.
4) Nachhärten. Schneiden.

Die Gallencapillaren erscheinen schwärzlich auf gelblichem Grunde gefärbt.

Darstellung des Faserwerks der Leber nach Böhm.

1) Härtung 1 ccm grosser Leberstückchen in $^1/_2$-proc. Chromsäurelösung 48 Stunden lang.
2) Uebertragen in 0,75-proc. Argentum nitricum-Lösung, 72 Stunden lang.
3) Einige Stunden lang in destillirtes Wasser.
4) Nachhärtung in Alkohol. Schneiden.

Die Fasern erscheinen schwarz.

Dieses Faserwerk lässt sich auch noch an in Alkohol gehärteten Präparaten darstellen nach der

Methode von Oppel.

1) Uebertragen der Stückchen aus dem Alkohol in eine wässerige 10-proc. Lösung von Kalium chromicum flavum, 24 Stunden lang.
2) Uebertragen in eine 0,75-proc. Argentum nitricum-Lösung. An Volum muss die Flüssigkeit das 20—30-fache des zu behandelnden Stücks betragen.
3) Wechseln der Argentum nitricum-Lösung nach 1 Stunde zum ersten, und nach 2—3 Stunden zum zweiten Male.
4) Nach 24 Stunden Abspülen in destillirtem Wasser.
5) Uebertragen in Alkohol. Schneiden.

Paraffineinbettung ist nicht zu empfehlen, da sie die so behandelten Stücke brüchig macht.

## Harnapparat.

Härtung wie bei Leber und Pankreas; auch Sublimat giebt manchmal gute Härtung. Wenn man eiweisshaltige Flüssigkeit innerhalb der Glomeruluskapseln und Harnkanälchen fixiren will, so wendet man die Kochmethode an, indem man nicht zu grosse Stückchen für 1—2 Minuten in kochendes Wasser wirft und in starkem Spiritus nachhärtet. Denselben Zweck erreicht man durch Härtung in absolutem Alkohol und Celloidineinbettung. Zur Untersuchung auf degenerative Veränderungen kommen dieselben Methoden in Anwendung wie bei Leber und Pankreas; für alle feineren Untersuchungen ist Einbettung in Celloidin unerlässlich, weil sonst immer ein Theil des functionirenden Parenchyms, namentlich in pathologisch veränderten Nieren, ausfällt. Färbung mit den kernfärbenden Mitteln.

Die mikroskopische Untersuchung des Harnes nimmt man in der Weise vor, dass man denselben sedimentiren lässt und das Sediment, welches mit der Pipette entnommen wird, frisch auf dem Objectträger oder als Deckglastrockenpräparat untersucht. Letzteres namentlich dann, wenn die Untersuchung auf die Gegenwart von Bakterien gerichtet ist.

Tuberkelbacillen sind bei Tuberculose des Harnapparates meist nur spärlich im Harn vorhanden. Man lässt deshalb am besten möglichst vollständig, 24 Stunden lang, sedimentiren und färbt gleich von vornherein eine grössere Anzahl von Deckglastrockenpräparaten, etwa 6—10 und mehr, nach den bekannten Methoden. Ebenso kann auch das Centrifugirungsverfahren (s. p. 7) mit Nutzen in Anwendung gezogen werden. Auch hier ist die Methode von Gabbet (cf. p. 80) wegen ihrer Einfachheit und Sicherheit in erster Linie zu empfehlen. Daneben kann aber in zweifelhaften und wichtigen Fällen 24-stündiges Färben in Anilinwasserfuchsin bei Brütofentemperatur etc. von Nutzen sein.

Zur Untersuchung des Harns auf zellige Bestandtheile ist es oft rathsam, das Sediment mit Wasser oder Kochsalzlösung zu verdünnen; Essigsäurezusatz lässt die Zellen schärfer hervortreten; ebenso kann man sich dieselben deutlicher zur Anschauung bringen, wenn man vom Rande des Deckglases einige Tropfen Löffler'scher Methylenblaulösung zufliessen lässt.

Will man Präparate conserviren, so stellt man sie als Deckglastrockenpräparate her und färbt ebenfalls mit Löffler'schem Methylenblau oder mit Bismarckbraun.

Die Untersuchung auf Harncylinder wird sehr erleichtert, wenn man das Sediment in ganz dünner Jodjodkaliumlösung, die eine weingelbe Farbe hat, suspendirt.

Blut im Harn lässt sich meist mikroskopisch direct nachweisen, weil einzelne Blutkörperchen wenigstens so weit erhalten sind, dass sie eine Diagnose gestatten; ausserdem kann man in zweifelhaften Fällen dann noch die Häminprobe (cf. p. 126) anstellen.

Auf krystallinische Beimengungen untersucht man das Sediment im frischen Präparat.

Das saure harnsaure Natron, welches in grösserer Menge das sog. Ziegelsediment bildet, ist amorph.

Reine Harnsäure erscheint hauptsächlich in Wetzsteinform oder in rhombischen Tafeln oder in langen spitzen Formen.

Harnsaures Ammoniak kommt bei Zersetzung des Harnes vor und bildet stechapfelförmige Krystalle.

Phosphorsaure Ammoniakmagnesia = Tripelphosphat erscheint in Sargdeckelform.

Oxalsaurer Kalk bildet briefcouvertförmige Krystalle.

Kohlensaurer Kalk bildet Kugel- und Bisquitformen.

Bilirubin kommt amorph oder in gelblichen rhombischen Täfelchen vor.

Cystin bildet regelmässige sechseckige Tafeln, Tyrosin bildet Nadeln in Büschelform, Leucin kommt in Form von Kugeln vor.

## Untersuchung des Respirationsapparates und des Sputums.

Härtung in Müller'scher Flüssigkeit ist vorzuziehen. Alkoholhärtung dann, wenn man auf Fibrin oder auf Bakterien untersuchen will. Zur Schnellhärtung eignet sich Gummiglyzerin (p. 13). Zur Fixirung von entzündlicher Oedemflüssigkeit Kochen (p. 13) und nachfolgende Härtung in starkem Spiritus. In allen Fällen, wo es sich um einen abnormen Inhalt in den Lungenalveolen handelt, ist die Celloidineinbettung angezeigt.

Färbung mit den gewöhnlichen kernfärbenden Mitteln; ausserdem kommen die specifischen Bakterienfärbungen und die Weigert'sche Fibrinfärbung (s. p. 95) in Betracht.

Das **Sputum** kann man unverdünnt oder mit Kochsalzlösung verdünnt frisch untersuchen; meist ist jedoch eine Verdünnung nicht nothwendig. Bei der Untersuchung des Sputums muss man vor allen Dingen berücksichtigen, dass dasselbe zellige Beimengungen aus der Mund- und Rachenhöhle enthält und dass ihm namentlich auch Speisereste beigemischt sein können.

Man kann die Sputumzellen aber auch in Alkohol, Flemming'scher Lösung oder Sublimat härten und im Schnitt untersuchen. Bei dieser Methode werden die Zellen besser erhalten.

Ausser Speichelkörperchen, Plattenepithelien der Mundhöhle, Rundzellen und Schleimzellen finden sich im Sputum oft auch grosse Zellen, die Epithelien ähnlich sind, aber eine mehr runde Form besitzen als diese. Sie haben einen grossen bläschenförmigen Kern und sind wohl nicht in allen Fällen als desquamirte Alveolarepithelien aufzufassen. Sie enthalten oft Pigment. Sie kommen auch bei einfacher Bronchitis vor.

Pigment resp. Pigmentkörnchenzellen im Sputum können von Hämorrhagien herrühren, namentlich bei Stauungen im kleinen Kreislauf, die durch Insufficienz der Mitralis bedingt sind; es finden sich dann neben dem Pigment oft noch rothe Blutkörperchen vor.

In den bei weitem meisten Fällen handelt es sich aber um Pigmentarten, welche mit der Athmungsluft in die Lungen eingedrungen sind.

Diese letzteren Pigmentarten geben — vorausgesetzt, dass es sich nicht um Siderosis handelt — keine Eisenreaction mit Ferrocyankalium und Salzsäure (p. 52). Ausserdem sind sie meist mehr schwarz gefärbt, während das Blutpigment einen braunrothen Farbenton zeigt. Doch ist der Farbenunterschied allein nicht maassgebend.

Fibrinausgüsse der Bronchien sind schon makroskopisch an ihrer eigenthümlichen Form zu erkennen.

Die sog. Asthmakrystalle stellen lange, sehr spitzige Octaeder dar.

Die Curschmann'schen Spiralen sind bandförmige, spiralig gewundene Gebilde, die in ihrem Centrum einen helleren Faden zeigen. Fettsäure-Krystalle finden sich bei putrider Bronchitis, bei Lungengangrän, Lungenabscess, auch bei Cavernenbildung.

In jedem Sputum finden sich Mikroorganismen der verschiedensten Art.

Sowohl die Tuberkelbacillen wie die elastischen Fasern finden sich vorzugsweise in kleinen, pfropfenartigen Bröckeln des Sputums,

auf die man daher bei der Untersuchung vorzugsweise sein Augenmerk zu richten hat, wenn es sich um den Nachweis von Tuberkelbacillen oder von elastischen Fasern handelt (Sedimentirung des Sputums s. p. 79). Zur Untersuchung auf Bakterien kommt die Deckglastrockenmethode zur Anwendung. Auf elastische Fasern untersucht man entweder in der Weise, dass man zu dem frischen Sputumpräparat 1-proc. Kalilauge zutreten lässt, oder so, dass man das Sputum mit 10-proc. Kalilauge kocht, dann sedimentiren lässt und nach 12—24 Stunden das Sediment untersucht.

## Untersuchung des Centralnervensystems.

Für die Conservirung und Härtung von Stücken aus dem Centralnervensystem kommt fast ausschliesslich Müller'sche Flüssigkeit in Betracht. Beim Rückenmark dauert die Härtung, wenn sie eine vollkommene sein soll, 3—4 Monate, beim Gehirn 4 Monate bis 1 Jahr. Man kann durch Einstellen in den Brütschrank die Härtungszeit erheblich abkürzen. Die Aufbewahrung in Müller'scher Flüssigkeit kann auf mehrere Jahre ausgedehnt werden, namentlich wenn dieselbe, nachdem die Härtung vollendet ist, mit Wasser auf die Hälfte verdünnt wird. Nachher können die Stücke auch noch eine Zeit lang in Spiritus aufbewahrt werden. Die Stücke sollen möglichst frisch in die Conservirungsflüssigkeit kommen.

Manchmal empfiehlt es sich, die Härtung im Anfang nicht in der Müller'schen Flüssigkeit von gewöhnlicher Concentration, sondern in einer Lösung, die nur 1 Proc. doppeltchroms. Kali enthält, vorzunehmen.

Bei experimentellen Untersuchungen kann man, um diesen Zweck zu erreichen, dem entbluteten Thiere Müller'sche Flüssigkeit in die Carotis interna vorsichtig injiciren.

Die Härtung in der Flemming'schen Lösung (p. 43 u. 48) ist sehr empfehlenswerth, wenn es sich um die Untersuchung degenerativer Veränderungen im Nervengewebe handelt.

Besonders bewährt hat sich zum Nachweis selbst geringfügiger degenerativer Veränderungen auch die

Methode von Marchi.

1) Möglichst kleine Stückchen werden 8 Tag lang (oder auch beliebig länger) in Müller'scher Flüssigkeit conservirt.
2) Uebertragung für 6—8 Tage lang in eine Mischung von:
   Müller'sche Flüssigkeit 2 Theile
   1-proc. Osmiumsäure 1 Theil.
3) Sorgfältiges Auswaschen in Wasser.
4) Nachhärten in Alkohol von steigender Concentration.
5) Einbetten in Celloidin.

Zerrungen sind bei der Herausnahme der Objecte aus der Leiche möglichst zu vermeiden.

Die degenerirten Partien erscheinen schwarz, alles Andere hellgrau. Nachfärbung in Karmin ist möglich. Am besten eignet sich Lithionkarmin (5-proc.) Die Färbung dauert mehrere Stunden. Auch Weigert'sche Färbung gelingt meist sofort, ohne dass man die Präparate in Müller'sche Flüssigkeit zurückbringt.

Zerzupfungspräparate von der Leiche frisch entnommenen Stücken des Centralnervensystems lassen sich nur schwer und unvoll-

kommen herstellen. Nach 3—8-tägigem Verweilen in Müller'scher Flüssigkeit gelingt die Zerzupfung leichter.

Für das Centralnervensystem stehen uns eine ganze Reihe von Färbungsverfahren zur Verfügung, die entweder einfache Kernfärbungen oder Färbungen der Achsencylinder oder Färbungen der Markscheiden sind.

I. In vielen Fällen genügen die einfachen Kernfärbungsmittel; namentlich sind dieselben geeignet zur Aufsuchung von Entzündungsherden.

II. Färbung der Ganglienzellen nach Nissl.

Es sind von dem Autor zwei Methoden angegeben worden, die beide gute Resultate geben.

Methode a.

1) Härtung in Alkohol von allmählich steigender Concentration. Die Stückchen sollen etwa $^1/_2$ cm dick sein.
2) Färbung der Schnitte in concentrirter wässeriger Fuchsinlösung, die so lange erwärmt wird, bis Dampfwolken aufsteigen.
3) Auswaschen 1—2 Minuten lang in absolutem Alkohol.
4) Aufhellung in Nelkenöl, bis keine Farbwolken mehr abgegeben werden.
5) Kanadabalsam.

Methode b.

1) Härtung wie bei a.
2) Färben in einer 0,5-proc. Methylenblaulösung, welche so lange erwärmt wird, bis Blasen aufsteigen und unter hörbarem Geräusch platzen.
3) Auswaschen, nachdem die Farblösung abgekühlt ist, in einer Mischung von

| | |
|---|---|
| Anilinöl | 20,0 |
| 90-proc. Spiritus | 200,0 |

bis keine Farbwolken mehr abgehen, und eine deutliche Differenzirung zwischen weisser und grauer Substanz eintritt.
4) Uebertragen des Schnitts auf den Objectträger, Abtrocknen mit Fliesspapier und Bedecken mit einem Tropfen Origanumöl, den man bald wieder abfliessen lässt.
5) Abtrocknen mit Fliesspapier, darauf Entfernen des noch im Schnitt vorhandenen Origanumöls mit Benzin.
6) Bedecken des Schnitts mit einer bis zur Consistenz dünnflüssigen Kanadabalsams abgedampftem Lösung von Colophonium in Benzin.
7) Durch die Flamme ziehen, wodurch sich das Benzincolophonium entzündet.
8) Bedecken mit einem Deckglas und leichtes Erwärmen, bis das Benzincolophonium den Raum zwischen Deckglas und Objectträger ganz ausfüllt.

III. Färbung der Achsencylinder nach Mallory.

Diese Methode ist ausserordentlich bequem und sicher, und lässt zugleich die Gliafasern sehr deutlich hervortreten.

Nach persönlicher Mittheilung des Autors verfährt man in folgender Weise:

1) Färbung der Schnitte 20 Minuten bis 1 Stunde lang in einer einige Wochen lang dem Sonnenlichte ausgesetzten und vor dem Gebrauch filtrirten Lösung von

| | |
|---|---|
| Phosphor-Molybdänsäure 10% | 10 Theile |
| Hämatoxylin | 1,75 Theile |
| Wasser | 200 Theile |
| Carbolsäure, krystallisirt | 5 Theile |

2) Auswaschen in 2—3 Mal gewechseltem 50% Alkohol 5—20 Minuten lang.
3) Entwässerung etc.

Die gefärbten Schnitte dürfen nicht zu lange in Alkohol absolut. verweilen. Achsencylinder und Glia erscheinen tiefblau. Die Färbekraft der Flüssigkeit nimmt mit der Zeit noch merklich zu, sodass ich sie später mit 3 Theilen destillirtem Wasser verdünnt habe.

IV. Eine bequeme und sichere Methode zur Darstelluug der Achsencylinder ist die VAN GIESON'sche (p. 41). Die Achsencylinder erscheinen braunroth, die Markscheide gelb, die Kerne blauroth, die Glia roth, die Ganglienzellen mit ihren Ausläufern roth, alles sklerotische Gewebe leuchtend roth. Die Methode darf daher als eine Universalfärbungsmethode um so mehr bezeichnet werden, als sie besser differenzirt und viel sicherer wirkt, wie die in den letzten Jahren recht unzuverlässig gewordenen Karminpräparate.

Die Färbung gelingt zwar auch an Alkoholpräparaten, doch ist MÜLLER'sche Flüssigkeit bei weitem vorzuziehen, da die Differenzirung viel stärker ist und die Gelbfärbung der Markscheiden besser hervortritt.

V. Die Färbung der Achsencylinder mit neutralem Karmin (s. p. 40) giebt oft gute Resultate. Am besten gelingen die Schnitte, wenn man sie in einer dünnen Lösung recht lange, bis 24 Stunden, liegen lässt und dann gründlich auswäscht. Das neutrale Karmin färbt die Achsencylinder, die Ganglienzellen und das Zwischengewebe. Degenerirte Partien erscheinen intensiver roth gefärbt.

Die Zeit, die zum Gelingen der Färbung nothwendig ist, ist sehr verschieden, je nach dem Alter der Präparate, der Härtung etc. Man kann die Färbung beschleunigen und auch intensiver machen, wenn man die Schnitte in eine Chlorpalladiumlösung (0,01 : 50) 10 Minuten lang legt und dann direct in die Karminlösung bringt. Auch Erwärmen beschleunigt die Färbung; in allen Fällen, wo es die Zeit zulässt, ist aber eine lange Färbung in dünner Lösung am meisten zu empfehlen.

Auch die Ganglienzellen färben sich mit neutralem Karmin, und zwar am besten, wenn man die Schnitte 24 Stunden lang in einer hellrosa gefärbten Lösung liegen lässt.

VI. Gute Resultate giebt die Färbung mit Boraxkarmin und nachfolgender Behandlung in salzsaurem Spiritus (s. p. 37). Man lässt aber die Schnitte länger — bestimmte Zeitangaben lassen sich nicht machen — in der Farblösung, von $^1/_4$ Stunde bis mehrere Stunden. Dann färben sich die Achsencylinder, das Zwischengewebe, die Kerne der Ganglienzellen und sonstige kernhaltige Gebilde.

Aehnliche Resultate erzielt man mit Lithionkarmin, welches in derselben Weise angewendet wird.

VII. Cochenillealaunfärbung der Achsencylinder nach Czokor:

| | |
|---|---|
| Cochenille | 1,0 |
| Alaun | 1,0 |
| Aqua | 100,0 |

erwärmt und bis auf die Hälfte des Volums eingekocht.

Färbung 24 Stunden lang. Auswaschen in Wasser.

Die Kerne haben einen violetten, die Achsencylinder einen mehr rothen Farbenton.

VIII. Karminfärbung der Achsencylinder nach Schmaus.

1) Härtung in Müller'scher Flüssigkeit (nicht auswaschen!)
2) Nachhärtung im absolutem Alkohol, im Dunklen.
3) Färben in einer durch halbstündiges Kochen hergestellten und nach dem Erkalten filtrirten Lösung von

| | |
|---|---|
| Karminsaurem Natron | 1,0 |
| Uranum nitricum | 0,5 |
| verrieben und gelöst in Wasser | 100,0 |

4) Auswaschen in Wasser etc.

Derselbe Autor empfiehlt auch eine Achsencylinderfärbung in Blackbleulösung (0,25:100,0 Alkohol [50-proc.]), der etwas Pikrinsäure zugesetzt ist. Färben 1 Stunde lang. Auswaschen in Wasser.

IX. Anilinblaufärbung der Achsencylinder nach Stroebe.

Zur gleichzeitigen Färbung der Achsencylinder und Markscheiden hat Ciaglinski Vorfärbung in Saffranin, Auswaschen in Wasser, Färben in Anilinblaulösung, Auswaschen in Wasser empfohlen. Stroebe hat die Methode dadurch wesentlich verbessert, dass er nach der Anilinblaufärbung nicht in Wasser, sondern in Alkalispiritus auswäscht.

Man verfährt nach Stroebe in folgender Weise:

1) Härtung in Müller'scher Flüssigkeit.
2) Färben $^1/_2$—1 Stunde in gesättigter wässeriger Anilinblaulösung.
3) Abspülen der schwarzblauen Schnitte in Wasser.
4) Uebertragen in eine Schale mit Alkohol, dem 20—30 Tropfen 1-proc. Aetzkalialkohol zugesetzt sind (Kali causticum 1:100 Alkohol, 24 Stunden stehen lassen, filtriren), bis der Schnitt hellbraunroth und durchscheinend geworden ist. Im Allgemeinen sind 1 bis mehrere Minuten nöthig.
5) Uebertragen in destillirtes Wasser 5 Minuten lang. Die Schnitte werden wieder hellblau.
6) Gegenfärbung in zur Hälfte mit Wasser verdünnter ges. Saffraninlösung $^1/_4$—$^1/_2$ Stunde lang.
7) Auswaschen und Entwässern in Alkohol. absolut. Xylol. Kanadabalsam.

X. Färbung von Sahli.

1) Sorgfältige Härtung in Müller'scher Flüssigkeit.
2) Färben der Schnitte, 10 Minuten bis mehrere Stunden lang, in einer Mischung von:

| | |
|---|---|
| Gesättigte wässerige Methylenblaulösung | 24,0 |
| Destillirtes Wasser | 40,0 |
| 5-proc. Boraxlösung | 16,0 |

3) Auswaschen in Wasser oder Alkohol, bis sich die graue Substanz hell von der tiefblau gefärbten Marksubstanz abhebt.
4) Aufhellen in Cedernholzöl. Kanadabalsam.

Die Markscheiden werden tiefblau, die Ganglienzellen blass-grünlich, die Gliakerne blau. Die Methode ist namentlich geeignet zum Nachweis gleichzeitig vorhandener Bakterien. Die Präparate besitzen keine unbegrenzte Haltbarkeit.

XI. Eine isolirte Färbung der Achsencylinder erreicht man durch die Freud'sche Flüssigkeit.

1) Härtung in Müller'scher Flüssigkeit.
2) Färbung 3—5 Stunden lang in einer Lösung von
   1-proc. Goldchloridlösung } zu gleichen Theilen.
   95-proc. Alkohol }
3) Abwaschen in Wasser.
4) 2—3 Minuten in
   Natronlauge 1,0
   Aqu. destillata 6,0
5) Abwaschen in Wasser.
6) 5—15 Minuten in 10-proc. Jodkaliumlösung.
7) Abwaschen, Alkohol, Kanadabalsam.

Die Freud'sche Goldfärbung gelingt nicht immer gut. Die Nervenfasern erscheinen dunkelblau bis dunkelroth. Oft färbt sich auch ein Theil der Markscheiden mit. Die Manipulationen müssen mit Glasnadeln vorgenommen werden.

Es giebt eine grosse Reihe von Modificationen der Goldmethode. Cohnheim, der die Methode zuerst bei Darstellung der Nerven der Hornhaut anwendete, brachte die Schnitte in eine 0,5-proc. Goldchloridlösung und dann für einige Tage in mit Essigsäure angesäuertes Wasser. Die später empfohlenen zahlreichen Modificationen bestehen darin:

a) dass man viel stärker verdünnte Lösungen anwendet und in diesen dann die Schnitte entsprechend länger belässt;
b) dass man statt des Goldchlorids Goldchloridkalium oder Goldchloridnatrium anwendet;
c) dass man die Goldchloridlösung erneuert;
d) dass man zur Herbeiführung der Reduction an Stelle der Essigsäure, Salzsäure, Ameisensäure oder Weinsäure wählt.

Am besten gelingt die Goldmethode an frischem, noch nicht gehärtetem Material.

Hervorzuheben ist noch

XII. die Goldfärbung der Achsencylinder nach Upson.

1) Härtung 4—6 Monate lang, anfangs in 1-proc., später in 2-proc., öfter zu erneuernder Lösung von Kali bichromicum in dest. Wasser. Am besten in einem dunklen Zimmer.
2) Möglichst rasches Abspülen der gehärteten Stücke in destillirtem Wasser.
   Uebertragen für 2—3 Tage in öfter zu erneuernden 50-proc. Alkohol, der durch Verdünnen von absolutem Alkohol hergestellt ist.
3) Uebertragen in ebenfalls aus absolutem Alkohol herzustellenden 95-proc. Spiritus, bis die Schnitte eine deutlich grüne Farbe zeigen; gewöhnlich ist dies nach 2—4 Wochen erreicht.

4) Eventuell Celloidineinbettung. Schneiden.
5) Färben der Schnitte, 2 Stunden lang, in einer Lösung von
Goldchlorid 1,0
Aqu. destillat. 100,0
Salzsäure 2,0.
6) Abspülen der Schnitte in destillirtem Wasser.
7) Uebertragen für $^1/_2$ Minute lang in 10-proc. Kalilösung.
8) Auswaschen in Wasser.
9) Reduction in einer, für jeden Schnitt frisch herzustellenden Lösung von
Acid. sulphuric. 5 ccm
3-proc. Jodtinctur 10—15 Tropfen.
Mischen und Hinzufügen von
Liquor ferri chlorici 1 Tropfen.
10) Auswaschen in Wasser, sobald der Schnitt rosaroth geworden ist.
11) Alkohol. Nelkenöl. Kanadabalsam.

Die Schnitte sind im Dunklen aufzubewahren. Sämmtliche Manipulationen müssen mit Platin- oder Glasnadeln vorgenommen werden. Berührung mit Metallgegenständen zu vermeiden.

XIII. Nigrosinfärbung der Achsencylinder.
1) Färben der Schnitte 5—10 Minuten lang in einer conc. wässerigen Nigrosinlösung.
2) Entfärben erst in verdünntem, dann in absolutem Alkohol.
3) Origanumöl, Kanadabalsam.

Die Nigrosinfärbung ist bequem wegen ihrer Einfachheit und giebt gute Uebersichtsbilder, namentlich bei Degenerationsherden.

Unter den Färbungen, die eine Tinction der Markscheiden bewirken, steht obenan:

XIV. die Weigert'sche Hämatoxylinfärbung der Markscheiden.
1) Härtung in Müller'scher Flüssigkeit.
2) Nachhärtung in Alkohol, ohne vorhergehendes Auswaschen in Wasser.
3) Celloidineinbettung.
4) Der Celloidinblock mit dem Präparat 24—48 Stunden lang in eine zur Hälfte mit Wasser versetzte gesättigte Lösung von Cuprum aceticum.
5) 24 Stunden in 70-proc. Alkohol.
6) Schneiden.
7) Färben 15—20 Minuten — 24 Stunden in einer Lösung von
Hämatoxylin 1,0
Alkohol absolut. 10,0
Sol. Lith. carbonic. gesättigt 1 ccm
Aqu. destillata 60,0
8) Abspülen in reichlichen Mengen von Wasser.
9) Theilweise Entfärbung in einer Lösung von
Natr. biborac. 4,0
Rothes Blutlaugensalz 5,0
Aqu. destillat. 200,0

Die Zeit der Entfärbung unbestimmt, bis die graue Substanz deutlich gelb erscheint.

10) Abspülen in Wasser.

11) Entwässern in absolutem Alkohol.
12) Aufhellen in Carbolxylol (s. p. 29).
13) Einlegen in Xylolkanadabalsam.

Die in Müller'scher Flüssigkeit gehärteten Stücke müssen noch braun sein, sie dürfen nicht schon im Alkohol grün geworden sein. Sonst überträgt man sie für einige Minuten oder auch für längere Zeit in eine $^1/_2$-proc. Chromsäurelösung, spült sie dann nur ganz oberflächlich ab und bringt sie sofort in die Farbe. Man kann auch die Stücke oder die Schnitte für einige Zeit in Müller'sche Flüssigkeit zurückbringen.

Die Weigert'sche Methode giebt sehr klare Bilder, die Markscheiden erscheinen tief blauschwarz gefärbt; degenerirte Partieen erscheinen hell, und zwar um so mehr, je mehr Nervenfasern untergegangen sind. Reste von Marksubstanz, die von zerstörten Nervenfasern übrig geblieben sind, nehmen die Färbung oft auch noch an.

Die Dauer der Färbung in Hämatoxylin ist eine sehr schwankende. Rückenmarkschnitte färben sich oft schon in 15—30 Minuten. Schnitte der Hirnrinde gebrauchen bis zu 24 Stunden, wobei es oft auch gerathen ist, die Färbeflüssigkeit wenigstens einen Theil der Zeit im Brütofen zu belassen. Wenn man die Schnitte zu früh aus der Farblösung nimmt, so färbt sich nur ein Theil der Fasern, und es können dadurch schwere Täuschungen entstehen.

Manchmal ist es von Nutzen, die Entfärbung langsamer vorzunehmen, indem man die Blutlaugensalzlösung bis auf $^1/_2$ oder sogar $^1/_4$ verdünnt. Wenn man die Präparate in Origanumöl aufhellt, so darf man sie darin nicht länger, als unumgänglich nöthig lassen, weil sonst eine Entfärbung eintritt.

Will man ein Stück auch noch nach anderen Methoden färben, so schneidet man einen Theil, bevor man den Celloidinblock in die Kupferlösung bringt; man kann aber auch statt des ganzen Stücks erst die einzelnen Schnitte mit der Kupferlösung behandeln.

XV. Färbung der Markscheiden nach Weigert, ohne Differenzirung.

Diese, von Weigert angegebene Modification wird in folgender Weise ausgeführt:

1) Härtung etc. wie bei XIV.
2) Uebertragen in eine Mischung von
   Essigsaure Kupferlösung, gesättigt,
   10-proc. Seignettesalzlösung, ana
   24 Stunden im Brütofen.
3) Uebertragung in eine Mischung von
   Essigsaure Kupferlösung, gesättigt,
   Wasser, ana
   24 Stunden im Brütofen.
4) Färben in einer Lösung von
   Hämatoxylin 1,0
   Alkohol absolut. 10,0
   Gesättigte Lithion carbonicum-Lösung 7 ccm
   Aqu. destillat. 90,0
   (immer durch Zugiessen zu der alkoholischen Hämatoxylinlösung zu bereiten).

5) Auswaschen in Wasser,
6) Aufhellen in einer Mischung von

| | |
|---|---|
| Anilinöl | 2 Theile |
| Xylol | 1 Theil. |

In diese Mischung können die Schnitte schon aus 90-proc. Spiritus übertragen werden.
7) Einbetten in Xylol-Kanadabalsam.

Wenn das Cellodin zu stark gefärbt ist, so bringt man die Schnitte nach der Färbung in $^1/_5$-proc. Essigsäure. Wenn die Schnitte selbst überfärbt sind, so kann man auch die oben angegebene Entfärbungsflüssigkeit aus rothem Blutlaugensalz etc. anwenden.

Eine weitere brauchbare Modifikation der Weigert'schen Färbungsmethode ist

XVI. die Färbung von Pal.

1) Härtung in Müller'scher Flüssigkeit etc.
2) Färben in der Weigert'schen Hämatoxylinlösung, 24—48 Stunden lang, eventuell 1 Stunde bei Brütofentemperatur.
3) Auswaschen in Wasser, dem 1—2 Proc. Lithion carbonicum-Lösung zugesetzt ist; die Schnitte müssen tief blau gefärbt sein.
4) Uebertragen der Schnitte in eine 0,25-proc. Lösung von übermangansaurem Kali 20—30 Secunden lang, bis die graue Substanz gelb aussieht.
5) Uebertragen in eine Lösung von

| | |
|---|---|
| reiner Oxalsäure | 1,0 |
| Kalium sulphurosum | 1,0 |
| destillirtes Wasser | 200,0 |

für wenige Secunden.
6) Gründliches Auswaschen in Wasser.
7) Alkohol, Xylol, Kanadabalsam.

Die Methode hat den Vortheil, dass die einzelnen Proceduren viel schneller vorgenommen werden können; sie giebt sehr scharfe Bilder und eignet sich, weil alles zwischen den Nervenfasern liegende Gewebe vollständig entfärbt wird, gut zu Doppelfärbungen.

Man färbt am besten mit Pikrokarmin oder Boraxkarmin nach.

XVII. Modification der Weigert'schen Färbung von Vassale.

1) Härtung in Müller'scher Flüssigkeit; Nachhärtung in Alkohol.
2) Färben 3—5 Minuten lang in

| | |
|---|---|
| Hämatoxylin | 1,0 |
| Wasser (in der Wärme gelöst) | 100,0 |

3) Uebertragen 3—5 Minuten lang in gesättigte, filtrirte Lösung von essigsaurem Kupfer.
4) Schnelles Auswaschen in Wasser.
5) Uebertragen und Umrühren in einer Lösung von

| | |
|---|---|
| Borax | 2,0 |
| Rothes Blutlaugensalz | 2,5 |
| Wasser | 300,0 |

6) Gründliches Auswaschen in Wasser.
7) Alkohol, Carbolxylol (1 : 3). Kanadabalsam.

Anscheinend muss die Hämatoxylinlösung frisch sein, wenn die Methode gelingen soll.

XVIII. Färbung der Markscheiden nach Kulschitzky.

1) Härtung in Müller'scher oder besser noch in Erlicki'scher Flüssigkeit (in letzterer 1—2 Monate, Nachhärtung in Alkohol).
2) Färbung, 18—24 Stunden, in einer vor dem jedesmaligen Gebrauch durch Essigsäure ganz leicht angesäuerten Lösung von

| | |
|---|---|
| Hämatoxylin (mit Alkohol absolut. q. s. gelöst) | 1,0 |
| Gesättigte Borsäurelösung | 20,0 |
| Destillirtes Wasser | 80,0 |

3) Auswaschen in Alkohol.

Die Farblösung von Kulschitzky ist anfangs gelb gefärbt, nach 2—3 Wochen wird sie gesättigt roth und ist dann brauchbar. Vor der jedesmaligen Anwendung setzt man zu einer Uhrschale voll der Lösung einige Tropfen Essigsäure.

Es werden ausschliesslich die markhaltigen Nervenfasern intensiv blau gefärbt, alles Uebrige bleibt farblos oder bekommt eine schwach gelbliche Farbe. Die Färbung wird besonders hübsch, wenn man die Schnitte 24 Stunden in einer gesättigten Natron- oder Lithion carbonicum-Lösung verweilen lässt.

Eine neuere, von Kulschitzky angegebene Modification ist folgende:

1) Färbung 1—3 (selten 24) Stunden lang in

| | |
|---|---|
| Hämatoxylin, gelöst in absolutem Alkohol | 1,0 |
| 2-proc. Essigsäure | 100,0 |

2) Entfärbung (gewöhnlich 2—3 Stunden lang) in

| | |
|---|---|
| Lithion carbonicum, gesättigte Lösung | 100 ccm |
| 1-proc. Lösung von rothem Blutlaugensalz | 10 „ |

3) Gründliches Auswaschen in Wasser.

Eine ganz ähnliche Färbung lässt sich erzielen, wenn man 2 g Karmin (oder mehr) in 100 g 10-proc. Essigsäure 1—4 Stunden kocht. In dieser Lösung verbleiben die Schnitte 2—4 Stunden und kommen dann direct in die vorstehend angegebene Entfärbungsflüssigkeit.

XIX. Methode von Exner zur Darstellung markhaltiger Nervenfasern.

Die Stückchen müssen möglichst frisch der Leiche entnommen sein, doch gelingt die Methode auch noch nach 12 Stunden. Es werden aus dem Gehirn oder Rückenmark Stückchen, die nicht über $^1/_2$ cm dick sein dürfen, ausgeschnitten und sofort in eine 1-proc. Osmiumsäurelösung übertragen, welche mindestens an Volum das 10fache von dem zu färbenden Stückchen betragen muss. Nach 2 Tagen wird die Osmiumsäure erneuert. Am 5. oder 6. Tage werden die Stückchen in Wasser abgewaschen und entweder direct, nachdem sie auf Kork geklebt sind, oder nach vorheriger Einbettung geschnitten. Die einzelnen Schnitte kommen sofort in Glyzerin; auf dem Objectträger wird dem Glyzerin 1 Tropfen Ammoniakwasser (Liquor Ammon. caust. 1 : 50 Aqua) zugesetzt.

Die markhaltigen Nervenfasern erscheinen nach der Methode von Exner grau bis schwarz, die Präparate sind aber nicht haltbar.

XX. Methode von Adamkiewicz.

Adamkiewicz hat auf die Eigenschaft des Saffranins aufmerksam gemacht, die Markscheiden der Nervenfasern roth, die Kerne der Nerven- und Gliazellen sowie die der Gefässzellen dagegen violett zu färben. Die Markscheide der Nervenfasern nimmt aber diese Färbung nicht

mehr an, sobald die Nervenfaser erkrankt ist, auch schon nicht mehr im allerersten Stadium der Erkrankung. Die Methode ist folgende:

1) Härtung in Chromsalzlösungen.
2) Die Schnitte werden für kurze Zeit in Wasser übertragen, welches durch Zusatz einiger Tropfen Salpetersäure eine schwach saure Reaction angenommen hat.
3) Färbung in wässeriger tief-burgunderrother Lösung von Saffranin No. 0. Es tritt nicht leicht Ueberfärbung ein.
4) Abwaschen in gewöhnlichem Alkohol.
5) Uebertragen in durch Salpetersäure schwach angesäuerten absoluten Alkohol.
6) Aufhellen in Nelkenöl so lange, bis kein röthlicher Farbstoff mehr abgeht.
7) Einschluss in Kanadabalsam.

Dem oben Gesagten zu Folge färbt sich das Nervenmark gelbroth oder roth, die Bindegewebskerne werden blauviolett.

Die Resultate der Färbung sind aber durchaus keine so constanten und guten, wie A. angiebt; eine Verbesserung und Modification bietet das Verfahren von Nikiforoff:

1) Härtung in Chromsalzen.
2) Directe Nachhärtung in Spiritus, ohne vorheriges Auswaschen in Wasser.
3) Die einzelnen Schnitte kommen direct in Alkohol.
4) Färbung, 24 Stunden lang, in concentrirter wässeriger Saffraninlösung oder in Anilinwassersaffranin oder Carbolwasser (5-proc.)-Saffranin.
5) Vorsichtiges Auswaschen in Alkohol durch Hin- und Herbewegen, bis die graue Substanz beginnt sich durch ihre hellere Färbung von der Marksubstanz abzuheben.
6) Uebertragen in Chlorgoldlösung 1 : 500 so lange, bis die graue Substanz einen Stich ins Violette bekommt.
7) Sorgfältiges Auswaschen in Wasser.
8) Uebertragen in Alkohol absol. so lange, bis die graue Substanz durch ihre reinviolette Farbe sich von der rothen Marksubstanz deutlich abhebt.
9) Kurze Zeit in Nelkenöl.
10) Xylol.
11) Kanadabalsam.

XXI. Silbermethode zur Darstellung der Ganglienzellen und ihrer Ausläufer nach Golgi.

Die in Müller'scher Flüssigkeit gehärteten Stücke, welche nur klein sein dürfen, kommen direct aus der Härtungsflüssigkeit in eine 0,75-proc. Argentum nitricum-Lösung, welche nach $^1/_2$ Stunde gewechselt wird. In der erneuerten Lösung kann das Stück beliebig lange bleiben. Nach 5—6 Tagen kann es, nachdem es oberflächlich abgetrocknet ist, erst in verdünnten, dann in absoluten Alkohol gebracht und dann geschnitten werden.

Alkohol — Nelkenöl — Kanadabalsam.

Die Ganglienzellen und ihre Ausläufer erscheinen schwarz imprägnirt; ebenso die Bindegewebszellen. Die Methode ist sehr unsicher, sie färbt fast nie alle Ganglienzellen. Eine Verbesserung stellt die Sublimatmethode desselben Autors dar.

XXII. Sublimatmethode zur Darstellung der Ganglienzellen und ihrer Ausläufer nach Golgi.

Die in Müller'scher Flüssigkeit gehärteten Stückchen, welche nicht dicker als 0,5 cm sein sollen, kommen in eine 0,25-proc. wässerige Sublimatlösung, die so oft erneuert wird, als sie sich noch gelb färbt. Nach 8—10 Tagen sind kleine Stückchen schon brauchbar und können geschnitten werden; doch tritt die Reaction um so besser ein, je länger man die Schnitte in der Lösung belässt.

Die Schnitte müssen sehr gut ausgewaschen werden.

Dann: Alkohol — Oel — Kanadabalsam.

Auch hier sehen die Ganglienzellen und ihre Ausläufer schwarz aus. Die Methode ist ebenfalls unsicher.

Eine Verbesserung von Pal besteht darin, dass man die Schnitte mit einer Lösung von Natrumsulphid ($Na_2S$) einige Minuten lang nachbehandelt.

Auch die nach der Sublimatmethode hergestellten Schnitte sind noch sehr empfindlich und können, ebenso wie die Silberschnitte, nicht unter einem Deckglas aufgehoben werden.

Eine Conservirung unter dem Deckglas, sowie eine nachträgliche Färbung soll ermöglichen

XXIII. die Methode von Obregia.

1) Die nach Golgi behandelten Sublimat- oder Silberpräparate dürfen nur mit Spiritus in Berührung kommen, der nicht schwächer ist, als 95-proc. Aus diesem gelangen sie in eine frisch bereitete und $^1/_2$ Stunde lang dem diffusen Licht ausgesetzte Lösung von
   1-proc. Eisenchloridlösung 8—10 Tropfen. (Keine Metallnadeln!)
   Absoluter Alkohol 10 ccm.

In dieser Flüssigkeit verweilen die Schnitte 15—30 Minuten lang im Dunkeln.

2) Rasches Abspülen in 25-proc. Alkohol, dann in destillirtem Wasser.
3) Uebertragen für 5—10 Minuten (nicht länger!) in 10-proc. Natriumsulphidlösung.
4) Mehrmaliges Auswaschen in destillirtem Wasser.
5) Eventuelle Färbung mit Karmin, Hämatoxylin, nach Weigert, Pal etc. Einschluss in Kanadabalsam, Bedecken mit einem Deckglas.

Die zweckmässigste Modification des Golgi'schen Verfahrens ist die von Kölliker noch etwas umgeänderte

XXIV. Methode von Ramon y Cajal.

1) Die Stückchen gelangen frisch, im Dunkeln, für 24—36—48 Stunden, in eine Lösung von

| | | |
|---|---|---|
| Kalium bichromicum | 3 | Theile |
| 1-proc. Osmiumsäurelösung | 25 | „ |
| Aqu. destillat. | 100 | „ |

Die erste Flüssigkeit ist nach einigen Stunden zu erneuern, sie kann aber nochmals als Anfangslösung für weitere Stücke verwandt werden.

2) Abspülen $^1/_4$—$^1/_2$ Stunde lang in 0,25-proc. Höllensteinlösung.
3) Uebertragen für 36—48 Stunden in eine 0,75-proc. Höllensteinlösung.
4) Auswaschen in 40-proc. Alkohol.
5) Kurzes Entwässern in absolutem Alkohol.
6) Schneiden zwischen Hollundermark, mit der Hand etc.

Paraffin- und Celloidineinbettung ist zu vermeiden, Deckgläser dürfen nicht aufgelegt werden.

Die übrigens sehr werthvolle Methode gelingt nicht immer. Ausserdem färbt sie niemals an ein und demselben Präparate alle Theile gleich schnell und gleich gut.

Die Nervenzellen mit ihren Ausläufern und alle nicht mit einer Markscheide umgebenen Nervenfasern färben sich tiefschwarz, die Neurogliazellen mit ihren Ausläufern röthlich-schwarz.

XXV. Modification der Golgi'schen Sublimatmethode von Flechsig:

Um den Zusammenhang der Ganglienzellenausläufer mit dem in der grauen Substanz vorhandenen Faserfilz, namentlich auch mit dessen markhaltigen Elementen darzustellen, hat Flechsig die folgende Methode angegeben. Zu bemerken ist dabei, dass das nach dieser Methode zuerst untersuchte Gehirn nach der Härtung in Müller'scher Flüssigkeit 1 Jahr lang in 1-proc. Sublimatlösung gelegen hatte.

1) Härtung in 2-proc. wässeriger Lösung von chromsaurem Kali.
2) Imprägnation mit Sublimat.
3) Schneiden. Die einzelnen Schnitte werden in 96-proc. Alkohol übertragen.
4) Färben 3—8 Tage lang, bei 35° C, in einer Lösung von:

| | |
|---|---|
| reinem Extract von japan. Rothholz | 1 g |
| absoluter Alkohol | 10 „ |
| destillirtes Wasser | 900 „ |
| gesättigte Lösung von Glaubersalz | 5 „ |
| gesättigte Lösung von Weinsteinsäure | 5 „ |

5) Uebertragung jedes einzelnen Schnittes in 3 ccm einer $^1/_4$ bis $^1/_5$-proc. Lösung von Kalium hypermanganicum, so lange, bis die Lösung den bläulichen Farbenton verloren hat.
6) Entfärben in einer Lösung von

| | |
|---|---|
| Acid. oxalic. | 1,0 |
| Kal. sulphuros. | 1,0 |
| Aqu. destillat. | 200,0. |

Wenn die Entfärbung nicht vollkommen ist, von neuem Kali hypermanganic. und Entfärbung, bis jeder gelbe Farbenton aus dem Schnitt geschwunden ist.

7) Uebertragen der Schnitte in eine Mischung von

| | |
|---|---|
| 1-proc. Goldchloridkaliumlösung | 5 Tropfen |
| Alkohol absolut. | 20 ccm, |

bis die Sublimatniederschläge, die im Schnitt bei auffallendem Licht weisslich aussehen, tief-schwarz geworden sind, und die rothen Nervenfaserbündel einen bläulichen Ton angenommen haben.

8) Ganz kurzes Auswaschen in
5-proc. Cyankalilösung 1 Tropfen
Aqua destillat. 20 g.
Der Schnitt muss auf der Lösung schwimmen.
9) Entwässern in absolutem Alkohol.
10) Aufhellen in reinem Lavendelöl.
11) Kanadabalsam.

Sämmtliche Nervenfasern sind nun karminroth, die Ganglienzellen mit ihren Ausläufern aber tief-schwarz gefärbt.

XXVI. Färbung der Achsencylinder nach Wolters.

1) Härtung (in der Dunkelkeit) 24 Stunden lang in einer Lösung von
schwefelsaurem Kupferoxyd } in beliebiger Menge
Kaliumbichromat }
50-proc. Spiritus, dem auf je 100 ccm 6 Tropfen Eisessig zugesetzt sind.
2) Uebertragung für 24 Stunden in absoluten Alkohol. Einbettung in Celloidin. Schneiden.
3) Uebertragung der Schnitte für 24 Stunden in eine Beize von
Vanadium chloratum, 10-proc. 2 Theile
Ammonium aceticum liquidum, 8-proc. 8 „
4) 10 Minuten langes Auswaschen in Wasser.
5) Färben 24 Stunden lang, auf dem Paraffinofen, in
Hämatoxylin 2,0
Alkohol absolut. q. s. ad. solut.
3-proc. Essigsäure 100,0
6) Auswaschen in 80-proc., salzsäurehaltigem Spiritus, bis die Präparate einen hellblaurothen Ton haben.
7) Entfernung der Salzsäure in schwachem Alkohol, Entwässerung in absolutem Alkohol, Origanumöl, Kanadabalsam.

Ausser den Achsencylindern färben sich auch die Ganglienzellen und Gliaelemente.

XXVII. Darstellung der Gliafasern.

Die Gliafasern treten zum Theil bei der Nigrosinfärbung und bei der von Gieson'schen Methode deutlicher hervor. Sehr gut werden sie nach der Methode von Mallory (p. 108) gefärbt, die sich daher auch für Gliome, empfiehlt. Besonderer Erwähnung verdient dann namentlich auch die Modification der Weigert'schen Fibrinfärbung von Beneke (s. p. 96).

Kultschitzky hat folgende Methode angegeben:

I. Härtung, 2—3 Monate lang, im Dunkeln in einer gesättigten Lösung van Kupfersulphat und doppelt chromsaurem Kali in 50-proc. Alkohol, dem $^1/_2$-proc. Essigsäure zugesetzt ist, dann Uebertragen in 96-proc. Spiritus, ebenfalls im Dunkeln.

II. Färben $^1/_2$ Stunde lang oder länger in
Rubin, patentsaures 0,25 Theile
Essigsäure 2-proc. }
Pikrinsäurelösung, gesättigte } je 100 Theile.
Alkohol 96-proc. }

III. Auswaschen in 96-proc. Spiritus, absoluter Alkohol, Aufhellen, Kanadabalsam.

Die Neuroglia erscheint rothviolett, Ganglienzellen und Achsencylinder gelbroth.

## Periphere Nerven und Ganglien.

werden im Allgemeinen gleich behandelt wie das centrale Nervensystem. Zupfpräparate geben oft gute Bilder.

Zur Darstellung von marklosen Nervenfasern und von Nervenursprüngen in Muskelstückchen hat Mays folgendes Verfahren angegeben:

1) Die betreffenden Organstückchen lässt man in 5-proc. Arsensäure vollkommen aufquellen.
2) Uebertragen 20 Minuten lang in eine Mischung von

| | |
|---|---|
| 1-proc. Goldchloridkaliumlösung | 4,0 |
| 2-proc. Osmiumsäure | 1,0 |
| 0,5-proc. Arsensäure | 20,0. |

3) Abspülen mit Wasser.
4) Uebertragung in eine 1-proc. Arsensäurelösung, und in dieser bei 45° auf dem Wasserbad bis 3 Stunden lang der Sonne exponirt.
5) Aufhellen in einer Mischung von

| | |
|---|---|
| Glyzerin | 40,0 |
| Wasser | 20,0 |
| 25-proc. Salzsäure | 1,0 |

Vielfache Anwendung hat in neuerer Zeit zur Darstellung der peripheren Elemente gefunden die zuerst von Ehrlich benutzte und später von den verschiedensten Untersuchern modificirte:

### Methode der Methylenblauinjection.

1) In die Blutgefässe derjenigen Organe, in welchen man die Nervenelemente färben will, injicirt man sofort oder wenigstens bald nach dem Tode eine vorher filtrirte 4-proc. Lösung von Methylenblau (am besten „rectificirtes Methylenblau zur vitalen Injection“ von Dr. Grübler, Leipzig).

Dann setzt man das betreffende Organ dem Einfluss der Luft aus und wartet ab, bis eine blaue Tinction sichtbar geworden ist, worüber man sich eventuell durch Anfertigung frischer Zupfpräparate Gewissheit verschafft.

2) Sobald überhaupt eine Färbung eingetreten ist, bringt man das Object zur Fixirung der Farbe in eine vor dem Gebrauch filtrirte, kalt gesättigte, wässerige Lösung von pikrinsaurem Ammoniak, oder wenn man Schnitte anfertigen will, in eine kalt gesättigte spirituöse Lösung von pikrinsaurem Ammoniak, für 20 Minuten bis 12 Stunden, je nach der Dicke des Stückes. Manchmal ist zur Fixirung noch geeigneter ein Gemisch von

| | |
|---|---|
| pikrinsaures Ammoniak, gesättigte wässerige Lösung, | 100 ccm |
| 1-proc. Osmiumsäure | 2 „ |

3) Die Schnitte werden entweder zwischen Amyloidleber, Hollundermark etc. (cf. p. 21) oder mit dem Gefriermikrotom angefertigt.

Die Schnitte oder Zupfpräparate werden eingelegt in eine Mischung von gleichen Theilen Glyzerin und Wasser, dem eine Spur von pikrinsaurem Ammoniak zugesetzt ist.

Wenn nun bei dieser Methode oft auch andere Gewebsbestandtheile

(Kittsubstanz, Nervenzellen, Blutkörperchen, Zellgewebe) mitgefärbt werden, so treten doch die Elemente des Nervensystems so deutlich hervor, dass eine Verwechslung unmöglich ist.

Degenerative Vorgänge am peripheren Nervensystem weist man durch Härtung in Flemming'scher oder Marchi'scher Lösung nach, durch welche die degenerirten Theile der Marksubstanz schwarz gefärbt werden.

Zum Nachweis degenerativer Veränderungen am Achsencylinder empfiehlt Obersteiner in neuester Zeit wieder das von Platner angegebene Eisenchlorid-Dinitroresorcinverfahren. Dasselbe besteht in Folgendem:

1) Härtung der Nervenstämmchen 1 bis mehrere Tage lang in einer Lösung von

| | |
|---|---|
| Liquor ferri sesquichlorat. | 1,0 |
| Aqu. destillat. | 4,0 |

2) Auswaschen in Wasser, bis dieses keine Reaction mit Rhodankalium mehr giebt.
3) Uebertragen der Stückchen in eine Lösung von Dinitroresorcin in 75-proc. Spiritus im Ueberschuss, bis mehrere Wochen lang je nach der Grösse des Stückes.
4) Entwässern, Einbettung, Schneiden.

Durch die Verbindung des Eisens mit dem Dinitroresorcin nimmt der Achsencylinder eine smaragdgrüne Farbe an. Es treten daher Veränderungen an ihm sehr deutlich hervor.

Die Färbung gelingt auch an Präparaten, die in Flemming'schem Gemisch oder in Müller'scher Flüssigkeit gehärtet sind.

## Sehorgan.

Für sämmtliche Abschnitte des Auges kommt als Härtungsflüssigkeit nur Müller'sche Flüssigkeit und Flemming's Chromosmiumessigsäuregemisch in Betracht. — Die Aufbewahrung in Müller'scher Flüssigkeit ist sehr lange möglich. Sollen Theile des Bulbus genauer untersucht und dabei die gegenseitigen Lagerungsverhältnisse der einzelnen Theile möglichst erhalten werden, so ist Einbettung in Celloidin nothwendig. Unter Umständen kann hier eine vorherige Färbung des Stücks mit Bismarckbraun (p. 38) oder Beale'schem Karmin (p. 38) rathsam sein, damit die einzelnen Schnitte möglichst wenig mechanischen Insulten, welche den Zusammenhang lockern können, ausgesetzt sind. Man kann auch Paraffineinbettung anwenden.

Zur Kernfärbung dienen Hämatoxylin und Alaunkarmin. Die Retina und der N. opticus werden mit den Methoden, die für das Centralnervensystem angegeben sind (p. 107), behandelt. In manchen Fällen sind Doppelfärbungen sehr zu empfehlen.

Für die Untersuchung der Cornea kann man die Goldmethode von Cohnheim anwenden. Die dem eben getödteten Thiere entnommene Cornea wird für 5 Minuten in frisch ausgepressten und filtrirten Zitronensaft, dann auf 20 Minuten in 1-proc. Goldlösung übertragen und schliesslich unter dem Einfluss des Lichts 3—4 Tage lang in Wasser, welches durch Essigsäure ganz leicht angesäuert ist, gehalten. Geschnitten wird in Alkohol.

## Gehörorgan.

Die Gewebe des Mittelohrs und des inneren Ohrs werden mit Müller'scher Flüssigkeit gehärtet; beim äusseren Ohr kann auch Al-

kohol benutzt werden. Ist zum Schneiden der zu untersuchenden Stellen eine Entkalkung des angrenzenden Knochengewebes nöthig, so ist dieselbe erst nach erfolgter Härtung vorzunehmen.

## Knochensystem.

Knochen und Gelenke werden in Müller'scher Flüssigkeit gehärtet; die Härtung in Alkohol liefert nicht so schöne Präparate. Ist eine Entkalkung nöthig, so darf dieselbe erst nach vollendeter Härtung vorgenommen werden. Die in Müller'scher Flüssigkeit gehärteten Präparate werden zunächst gründlich ausgewässert, einige Tage in Alkohol gelegt und dann erst entkalkt. Die Entkalkungsmethoden siehe p. 14.

Zur Einbettung empfiehlt sich vor Allem Celloidin, da die bei Paraffineinbettung nöthige Erwärmung gerade für den Knochen manche Nachtheile mit sich bringt.

Färbung mit Hämatoxylin; in vielen Fällen ist die Doppelfärbung mit Hämatoxylin und neutralem Karmin zu empfehlen; dieselbe giebt sehr schöne Präparate und übersichtliche Bilder, weil das neutrale Karmin den entkalkten Knochen, sowie osteoides, noch nicht verkalktes Gewebe roth färbt. Es ist aber, wenn diese Reaction eintreten soll, ganz besonders darauf zu achten, dass die in Hämatoxylin gefärbten Schnitte, nachdem sie ausgewaschen sind, noch 12 bis 24 Stunden in Wasser liegen bleiben, bevor sie in die Karminlösung kommen.

Die Grundsubstanz des verkalkten Knorpels, dessen Kalksalze ausgezogen sind, färbt sich mit Hämatoxylin meist intensiv blauviolett.

Unverkalkter Knorpel ist in seinem Verhalten gegen neutrales Karmin und Hämatoxylin incostant, doch kann man sagen, dass ruhender Knorpel sich im Allgemeinen besser mit Karmin, wuchernder und hypertrophischer Knorpel dagegen intensiver mit Hämatoxylin färbt.

Die Zellen des Knochenmarks treten namentlich bei Doppelfärbung mit Hämatoxylin und Eosin sehr scharf hervor.

Zum Studium der Ablagerungsverhältnisse der Knochensalze und zum Nachweise kalkloser Knochenpartieen hat dann auch Pommer eine Methode angegeben, welche sich auf die Eigenthümlichkeit der Müller'schen Flüssigkeit stützt, dass sie nicht nur bei länger dauernder Einwirkung auf die Knochen — durch ihre nur unvollständig entkalkenden sauren Salze — diese gut schneidbar macht, sondern hierbei auch den Unterschied zwischen den kalkhaltigen und kalklosen Knochenpartieen ausgeprägt und deutlich erhält, was bei in Säuren entkalkten Knochen nicht der Fall ist. Das Verfahren ist folgendes:

Die Knochen bleiben so lange in Müller'scher Flüssigkeit, bis sie mit einem scharfen Rasirmesser eben gut schneidbar geworden sind.

Es hebt sich dann in den angefertigten Schnitten die verkalkte Knochensubstanz durch ihr homogenes Aussehen scharf von den kalklosen Knochenpartieen ab, welch letztere auf das deutlichste ihre fibrilläre Structur hervortreten lassen.

Durch Karmintinction wird dann das Auffinden kleiner kalkloser Knochentheile sehr erleichtert, und die Schnitte gewinnen überhaupt an Uebersichtlichkeit.

Zur Färbung von Knochen, die in Säuren, z. B. in der v. Ebner'schen Flüssigkeit, entkalkt sind, empfiehlt Pommer:

1) Dahlia in einer Lösung von 0,04 ‰ oder
2) Saffranin 0,10—0,16‰ oder
3) Methylgrün 0,30‰ und mehr.

In 12—18 Stunden färben sich diejenigen Partieen, die vor der Entkalkung kalkhaltig waren, ziemlich intensiv in einer der genannten Lösungen, und zwar mit Saffranin oder Dahlia mehr als mit Methylgrün.

Die schon vor der Entkalkung kalklos gewesenen Partieen bleiben dagegen vollständig farblos und contrastiren so auf das deutlichste gegenüber den früher kalkhaltigen Theilen.

Eine Färbung des Knochengewebes mit Saffranin ist dann auch von Scheffer in der folgenden Weise empfohlen worden:

1) Entkalkung in Salpetersäure oder salzsäurehaltiger Kochsalzlösung.
2) Färbung in wässeriger Saffraninlösung 1 : 2000, $^1/_2$—1 Stunde lang.
3) Abspülen in Wasser.
4) Uebertragen in 0,1-proc. Sublimatlösung.
5) Glyzerinuntersuchung.

Ein Contact der Präparate mit Alkohol ist möglichst zu vermeiden. Will man deshalb die Schnitte als Dauerpräparate aufheben, so zieht man sie nach der Sublimatbehandlung nur flüchtig durch Alkohol und entfernt dann das Wasser zum grössten Theil durch Aufdrücken von Fliesspapier; der Rest wird durch langes Einlegen in Bergamottöl entfernt. Dann in Kanadabalsam.

Die **Sharpey'schen Fasern** kann man an unentkalkten Schnitten durch Behandlung mit 15-proc. Kochsalzlösung oder concentrirter Salzsäure sichtbar machen.

Zur Färbung macht man nach Kölliker die Schnitte zuerst in concentrirter Essigsäure durchsichtig, und färbt sofort $^1/_4$—1 Minute lang in unverdünnter Lösung von Indigokarmin. Auswaschen in Wasser, Einbettung in Glyzerin.

Auch nach der modificirten Weigert'schen Fibrinfärbungsmethode von Beneke lassen sich die Sharpey'schen Fasern darstellen.

Um die Höhlen und Kanälchen des Knochens bis in ihre feinsten Verzweigungen sichtbar zu machen, verfährt man nach v. Recklinghausen folgendermaassen:

Die Knochenschnitte werden mit Alaunlösung behandelt, z. B. durch Färben in einer stark alaunhaltigen Lösung von Alaunkarmin, und dann in Glyzerin oder Alaunglyzerin eingeschlossen. Auf diese Weise füllen sich die Kanälchen mit Kohlensäure, welche durch den säureartig wirkenden Alaun, oder auch durch saures Glyzerin aus dem kohlensauren Kalk des Knochens frei gemacht wird.

Man kann aber die Kanälchen auch dadurch sichtbar machen, dass man sie mit einer Farbstofflösung füllt, z. B. nach der Methode von Zimmermann: Dünne Schliffe werden in Xylol entfettet und gut getrocknet, in einer gesättigten alkoholischen Farbstofflösung mehrere Minuten lang gekocht und dann zum Trocknen 2—3 Tage lang auf die beiden Schenkel einer Pincette derartig aufgelegt, dass beide Flächen noch mit Farbstofflösung bedeckt sind. Schliesslich wird der überflüssige Farbstoff vorsichtig mit einem Skalpell abgeschabt, das Präparat noch einmal in Xylol geschliffen, abgepinselt und in Xylolkanadabalsam eingelegt.

In seltenen Fällen kann man sich zur Untersuchung pathologisch

veränderter Knochen auch der Schliffe bedienen. Man stellt die Knochenschliffe in der Weise [1]) her, dass man die Stücke zunächst in concentrirter Sublimatlösung fixirt, in Wasser auswäscht und in Alkohol nachhärtet. Dann wird das Stück durchgefärbt (s. p. 42), kleine Stücke abgesägt und diese für 24 Stunden in sehr dicke Gummilösung und ebensolange in 96-proc. Alkohol gebracht. Das an der Luft getrocknete Stück wird dann zunächst auf der einen Seite mit immer feineren Feilen glatt geschliffen, mit der Schnittfläche auf eine Glasplatte mittelst Gummilösung aufgeklebt und nun die andere Seite ebenfalls mit Feilen von zunehmender Feinheit geschliffen, bis der Schnitt durchsichtig ist.

### Muskeln und Sehnen. Sehnenscheiden. Schleimbeutel.

Muskeln und Sehnen, sowie Sehnenscheiden und Schleimbeutel werden in Müller'scher Flüssigkeit gehärtet. Die Schnitte von Muskeln lassen sich schlecht anfertigen, wenn man nicht in Celloidin einbettet. Färbung der Muskeln namentlich mit Pikrokarmin (p. 37), welches das Protoplasma gelb färbt. Ausserdem Hämatoxylin, Alaunkarmin; Doppelfärbungen mit Hämatoxylin und Karmin oder Eosin. Auch Pikrinsäure (s. p. 41) eignet sich zu Doppelfärbungen.

### Männlicher und weiblicher Geschlechtsapparat.

Härtung vorzugsweise in Müller'scher Flüssigkeit. Einbettung in Celloidin, namentlich bei Ovarien und Placenta.

Die Untersuchung von Schleimhautpartikeln aus dem Uterus auf Carcinom nimmt man am besten in der Weise vor, dass man die Stückchen in Alkohol härtet und in Celloidin einbettet. Es ist dann rathsam, gleich mehrere Stückchen auf einen Kork aufzukleben und zusammen zu schneiden. Man erreicht das sehr gut mittels der durch Umhüllung des Korks mit Papier hergestellten Schachteln (s. p. 18), und kann dann in einem Präparat gleich mehrere Schnitte von verschiedenen Stellen untersuchen.

Es erleichtert und beschleunigt das die Untersuchung sehr, weil oft nicht gleich das erste Stückchen, welches man einzeln schneidet, eine zur Untersuchung geeignete Stelle enthält, und weil man so viel mehr Wahrscheinlichkeit hat, auch Schnitte zu treffen, in denen ausser der eigentlichen Schleimhaut noch die oberflächliche Lage der Muscularis mit enthalten ist. Die Färbung geschieht in diesen Fällen einfach mit Hämatoxylin.

In ähnlicher Weise untersucht man Deciduafetzen und Placentareste.

---

## Fünfzehntes Capitel.

## Mikroskopische Untersuchungen zu gerichtlichen Zwecken.

### Untersuchung von Blutspuren.

Handelt es sich um die Frage, ob irgendwie zur Untersuchung kommende Flecke auf Holz- und Metallgegenständen, auf Kleider-

[1]) Vergl. Schaffer: Die Methodik der histologischen Untersuchung des Knochengewebes. Zeitschr. f. w. Mikrosk. Bd. X, p. 167.

stoffen etc. von Blut herrühren, so hat man sein Augenmerk zu richten entweder

I. auf den Nachweis der Blutkörperchen selbst mit ihrer charakteristischen Form oder

II. auf den Nachweis des Blutfarbstoffs.

I. Will man in noch frischen Flecken Blutkörperchen nachweisen, so genügt es, etwas von dem abgeschabten Fleck in 0,6-proc. Kochsalzlösung — destillirtes Wasser ist zu vermeiden — aufzuweichen und direct unter dem Mikroskop zu untersuchen.

Da die Blutkörperchen des Menschen und der Säugethiere rund und kernlos, die der übrigen Thiere aber oval und kernhaltig sind, so gestattet eine derartige Untersuchung auch die Beantwortung der Frage, ob die betreffende Blutspur vom Menschen resp. Säugethier oder von einer anderen Thierart stammt.

Die menschlichen Blutkörperchen sind grösser als die der Säugethiere. Sie haben einen Durchmesser von 0,0077 mm; am nächsten stehen ihnen in der Grösse die des Hundes, dann folgen Kaninchen, Schwein, Rind, Pferd, Katze und schliesslich Schaf.

Messungen mit dem Mikrometer, die jedoch, um ein sicheres Resultat zu erhalten, an möglichst vielen Blutkörperchen vorgenommen werden müssen, gestatten dann einen Wahrscheinlichkeitsschluss, ob die gefundenen Blutkörperchen menschlichem Blut entstammen oder nicht. Eine sichere Entscheidung ist nicht möglich, weil die Blutkörperchen sehr rasch Veränderungen in ihrer Grösse und Form eingehen. Sind die Blutspuren älter, so kann man ebenfalls oft noch Blutkörperchen in ihnen nachweisen, die in ihrer charakteristischen Form erhalten sind.

Es genügt aber dann zum Nachweis gewöhnlich nicht die einfache Kochsalzlösung, sondern man muss andere Zusatzflüssigkeiten verwenden. Unter diesen empfiehlt sich:

1) Die 30-proc. Kalilauge, bei deren Anwendung man sich vor einer Verdünnung mit Wasser sorgfältig zu hüten hat.

2) Flüssigkeit von Roussin:

| | |
|---|---|
| Glyzerin | 3 Thl. |
| conc. Schwefelsäure | 1 „ |

3) Modificirte Pacini'sche Flüssigkeit:

| | |
|---|---|
| Sublimat | 1,0 |
| Kochsalz | 2,0 |
| Glyzerin | 100,0 |
| Wasser | 300,0. |

Man verfährt bei der Anwendung dieser Flüssigkeiten ebenfalls so, dass man von dem betreffenden Fleck etwas abschabt, oder wenn es sich um Flecken auf Kleidern, Stoffen etc. handelt, etwas davon zerzupft, auf den Objectträger bringt und dann die betreffende Zusatzflüssigkeit zusetzt. Man beobachtet dann direct unter dem Mikroskop das Sichtbarwerden der Blutkörperchen, weil dieselben nach und nach durch die Einweichungsflüssigkeiten verändert werden.

Auf Grössenunterschiede in den Blutkörpern lässt sich natürlich bei alten Blutspuren, wo die Blutkörperchen noch viel mehr geschrumpft sind, viel weniger geben als bei der Untersuchung frischer Blutflecken.

Zu hüten hat man sich besonders vor der Verwechslung mit den

Sporen einiger Schimmelpilzarten. Diese letzteren sind aber sehr resistent gegen Säuren und Alkalien.

II. Viel sicherer ist der Nachweis des Blutfarbstoffs durch Darstellung der Häminkrystalle.

Das Hämin oder salzsaure Hämatin ist ein Derivat des Hämoglobins. Nach ihrem ersten Entdecker bezeichnet man die Häminkrystalle auch als Teichmann'sche Blutkrystalle.

Zu ihrer Darstellung aus eingetrocknetem Blut verfährt man folgendermaassen:

Befinden sich die Flecken auf harten Gegenständen, z. B. Holz, so werden sie sorgfältig abgeschabt und die rothe Masse auf einem Objectträger oder in einem flachen Uhrschälchen gesammelt und in einer geringen Menge destillirten Wassers aufgelöst.

Von Flecken in Leinwand oder anderen Stoffen schneidet man besser kleine Stückchen aus, legt sie auf Objectträger und zieht mit wenig destillirtem Wasser aus.

Nach Entfernung der ausgezogenen oder ausgepressten Gewebsstücke sowie etwaiger Verunreinigungen lässt man das mehr oder weniger roth gefärbte Wasser eintrocknen, setzt dann ein stecknadelkopfgrosses Tröpfchen 0,6-proc. Kochsalzlösung zu, breitet es über die Oberfläche aus und lässt es wieder eintrocknen. Ist dies geschehen, so kratzt man die angetrocknete Masse mit einem Scalpell etwas auf und trägt mit einem Glasstab reinen Eisessig — bei verdünnter Essigsäure gelingt die Probe nicht sicher — auf, deckt mit einem Deckgläschen zu und erwärmt über einer Spiritusflamme, bis der Eisessig Blasen bildet. Durch fortgesetztes gelindes Erwärmen wird danach der Eisessig verdampft, und es scheiden sich bei seiner Verflüchtigung die braunen Häminkrystalle aus. Je langsamer das Verdampfen des Eisessigs vor sich geht, desto grösser werden die Häminkrystalle. Es empfiehlt sich daher, das Verdampfen unter dem Deckglase zu bewirken.

Die Häminkrystalle sind in Wasser vollständig unlöslich, ebenso in Aether und Alkohol. Sie sind schwer löslich in Ammoniak, verdünnter Schwefelsäure und in Salpetersäure, leicht löslich in Kalilauge. Sie stellen kleine rhombische Täfelchen dar.

Die Beimengung fettiger Substanzen hindert oft die Entstehung der Häminkrystalle; man thut dann gut, den Fleck vorher mit Aether zu behandeln.

Auch die Beimengung von Rost auf eisernen Instrumente kann die Darstellung der Häminkrystalle verhindern.

## Untersuchung der Haare.

Bei der gerichtsärztlichen Untersuchung von Haaren kann es sich zunächst um die Frage handeln, ob die vorliegenden Haare vom Menschen oder vom Thiere stammen.

Für die differentielle Diagnose ist mikroskopisch Folgendes maassgebend:

1) Die äusserste Schicht des Haares, die Cuticula, besteht aus feinen Epidermisschuppen, die dachziegelartig übereinander liegen und mit ihren Spitzen alle nach dem freien Ende des Haares sehen. Wenn man diese Zellen nicht ohne weiteres deutlich sehen kann, so setzt man verdünnte Salpetersäure zu. Bei den meisten Thieren sind die Zellen der Cuticula viel grösser als beim Menschen, so dass sie viel deutlicher

hervortreten. Ausserdem stehen die Cuticulaschuppen bei vielen Thieren viel mehr ab und geben daher dem Haare ein viel ausgesprochenes gezähntes Aussehen als beim Menschen.

2) Die mittlere Schicht oder die Rindensubstanz besteht aus langgestreckten Hornzellen. Man kann dieselben durch Zusatz von verdünnter Salpetersäure ebenfalls deutlicher hervortreten lassen.

Die Rindensubstanz prävalirt beim Menschen an Breite sehr gegenüber der innersten Schicht der Marksubstanz; beim Thier findet gerade das umgekehrte Verhalten statt.

3) Die zellige Structur der Marksubstanz ist beim Menschen nur sehr undeutlich, beim Thiere dagegen sehr in die Augen fallend.

Beim Menschen fehlt die Marksubstanz häufig, namentlich auf einzelne Strecken, beim Thiere nur sehr selten, und dann immer nur an ganz vereinzelten Haaren. Selbstverständlich muss man das Haar in seiner ganzen Länge untersuchen.

Für die Entscheidung der Frage, ob Haare vom Menschen oder Thiere stammen, empfiehlt es sich in jedem einzelnen Falle, zum Vergleich sowohl menschliche Haare wie solche von den gewöhnlichen in Betracht kommenden Thierarten zu untersuchen.

Bezüglich der Körperstelle, von der zur Untersuchung kommende Haare stammen, ist zu bemerken, dass Barthaare am dicksten zu sein pflegen, mit 0,14—0,15 mm im Durchmesser, dann folgen der Reihe nach die weiblichen Schamhaare, die Haare der Augenlider, die männlichen Schamhaare, die männlichen Kopfhaare und schliesslich die weiblichen Kopfhaare mit etwa 0,06 mm Durchmesser. Dass hierbei sehr beträchtliche individuelle Unterschiede vorkommen, darf bei der Untersuchung nie vergessen werden. Dazu kommen die sehr erheblichen Altersunterschiede, da die Haare der Neugeborenen bedeutend dünner sind als die älterer Kinder und namentlich von Erwachsenen.

Die Haare der Neugeborenen enden in einer Spitze. Ebenso sämmtliche Haare, die in ihrem natürlichen Wachsthum durch keine Insulte: Schneiden, Druck der Kleidung, Maceration durch Schweiss etc. gestört wurden. Verschnittene Haare zeigen im Anfang eine scharfe, quere, später eine mehr abgerundete Trennung.

Ausgerissene Haare zeigen eine in der Regel nach unten offene, kolbige Wurzel, mit Resten des Haarbalgs; ausgefallene Haare besitzen eine nach unten geschlossene, glatte, atrophische Wurzel.

Für die Frage, ob bestimmte Haare einem bestimmten Individuum entstammen, kommen namentlich Vergleichsuntersuchungen zur Anwendung, wobei auf die Dicke des ganzen Haars sowie seiner einzelnen Schichten, auf die Farbe etc. zu achten ist. Dabei kann es von Nutzen sein, die Form und Beschaffenheit der Querschnitte der zu untersuchenden Haare mit einander zu vergleichen. Solche Querschnitte kann man zwar auch so anfertigen, dass man auf einer festen Unterlage feine Schnitte mit dem Rasirmesser macht; viel empfehlenswerther ist aber die Einbettung in Paraffin (cf. p. 18).

## Untersuchung von Samenflecken.

Wenn es sich um die Untersuchung von Flecken auf das Vorhandensein von Spermatozoen handelt, so versucht man zunächst, ob sich von den auf ihrer Unterlage mehr oder weniger fest anhaftenden Flecken

feine Schüppchen ablösen lassen. Derartige Schüppchen, die wegen ihrer Brüchigkeit vorsichtig behandelt werden müssen, werden dann auf dem Objectträger mit einem Tropfen destillirten Wassers aufgeweicht, wobei man die Vertheilung dadurch beschleunigen kann, dass man die Schüppchen mit zwei Nadeln auseinanderzupft. Die Untersuchung geschieht mit starker Vergrösserung und enger Blendung.

Ist die Substanz aber in die Unterlage derartig eingesogen, dass eine Ablösung von einzelnen Schüppchen unmöglich ist, so schneidet man von der Unterlage ein kleines Stückchen aus und weicht dasselbe in einem Uhrschälchen mit destillirtem Wasser $^1/_4$—2 Stunden lang auf. Hierbei wird ein Aufquellen der Spermatozoen verhindert, wenn man eine geringe Menge Salzsäure (1 Tropfen auf 40 ccm Wasser) zusetzt. Wenn man dann durch Aufdrücken eines Nadelstiels etc. das Gewebe auspresst, so giebt dasselbe eine molkige Flüssigkeit ab, die direkt untersucht werden kann.

In diesem letzteren Falle kann man die Untersuchung auch sofort auf dem Objectträger vornehmen, indem man von dem betreffenden Stoff ein kleines Partikelchen in Wasser zerzupft; es ist aber auch bei dieser Untersuchungsmethode eine vorherige Aufweichung des Fleckes dringend zu empfehlen.

Wenn man Spermatozoen gefunden hat, so kann man in der bekannten Weise Deckglastrockenpräparate herstellen und mit neutralem Karmin oder mit Fuchsin färben. Auch Doppelfärbung mit Hämatoxylin und Eosin giebt gute Bilder.

Unger empfiehlt ganz besonders Färbung (1 bis mehrere Stunden lang) in folgender Färbungsflüssigkeit:

| | |
|---|---|
| Methylgrün | 0,15—0,3 |
| Wasser | 100,0 |
| Salzsäure | 3 Tropfen. |

Diese Flüssigkeit kann einerseits als Erweichungsflüssigkeit für den zu prüfenden Stoff dienen; es wird dann direct unter dem Mikroskop untersucht: sie kann andererseits aber auch noch zur Färbung der Deckglastrockenpräparate angewandt werden. Der hintere Theil des Kopfes wird intensiv dunkelgrün, der vordere Theil hellgrün, das Mittelstück und der Schwanz heller als das hintere Kopfstück.

## Untersuchung von Deciduaresten.

Da die Decidua graviditatis durch ihre grossen, polygonalen oder mehr rundlichen Zellen sich von allen sonst in Betracht kommenden Gewebsbestandtheilen in charakteristischer Weise unterscheidet, so kann ihre Untersuchung bei Verdacht auf stattgehabten Abort nothwendig werden.

Man untersucht entweder frisch an Zupfpräparaten, oder besser nach vorheriger Härtung in Alkohol an kleinen Schnitten. Diese lassen sich aus freier Hand herstellen; auch kann man sie in einem Cylindermikrotom mit Paraffin umgiessen (cf. p. 25) und dann schneiden. Ebenso kann man zwischen frischem Hollundermark oder gehärteter Leber (cf. p. 21) schneiden.

Zur Färbung dient am besten Hämatoxylin.

# Register.


## A.

**Abbe**'scher Beleuchtungsapparat 1. 2.
**Abstrichpräparate**, frische 7.
**Achsencylinderfärbung** 108. 109. 110. 111. 119.
**Adamkiewicz**, Markscheidenfärbung 115.
**Agar** 67.
**Aktinomycespilz** 83.
**Alaunkarmin** 36.
**Alkoholhärtung** 9.
„ zur Darstellung der Mitosen 45.
**Altmann**'s Fixirung 45.
„ Darstellung der Zelleinschlüsse 46.
**Amethystfärbung** des Mucins 49.
**Ammoniak**, harnsaures 105.
**Ammoniakmagnesia**, phosphorsaure 105.
**Amyloid** 49.
**Amyloidleber** zum Einbetten von Objecten 21.
**Amyloidreactionen** 50.
**Amylum**, Nachweis 50.
**Anilinblaufärbung** der Achsencylinder 110.
**Anilinessigsäure** 8.
**Anilinwasser** 58.
**Anilinwassersaffranin** nach Babes 44.
**Apathy**, Hämatoxylinfärbung 36.
**Apochromat** 1. 2.
**Arnold**, Isolationsflüssigkeit 6.
„ Untersuchungsflüssigkeit 55.
**Asphaltlack** 33.
**Asthmakrystalle** 106.
**Atrophie** 47.
**Aufhellungsmittel** 33.
**Auge** 121.
**Auspinselung** von Schnittpräparaten 30.
**Ausschütteln** von Schnittpräparaten 30.

## B.

**Babes**, Anilinwassersaffranin 44.
**Bacillus** des Abdominaltyphus 77.
„ der Cholera 82.
„ „ Diphtherie 74.
„ „ Lepra 81.
„ des malignen Oedems 73.
„ der Mäuseseptikämie 76.
**Bacillus** des Milzbrands 73.
„ des Rauschbrands 75.
„ „ Rhinoskleroms 74.
„ „ Rotz 75.
„ „ Schweinerothlaufs 76.
„ der Syphilis 77.
„ des Tetanus 75.
„ der Tuberculose 78.
„ des Typhus 77.
**Bacterium coli commune** 77.
**Bakterien, anaerobe**, Züchtung 70.
„ Culturverfahren 66. 68.
„ Deckglastrockenpräparate 58.
„ epiphytische 101.
„ Färbung 58.
„ Geisseln 61.
„ Nährböden 67.
„ Schnittpräparate 61.
„ „ von Gelatineculturen 64.
„ Sporenfärbung 65.
„ Sterilisation 66.
„ Untersuchung auf dem Objectträger 57.
„ Untersuchung im hängenden Tropfen 57.
„ Züchtung der einzelnen Arten 70.
**Bandwürmer** 87.
**Baranski**, Aktinomycesfärbung 84.
**Baumgarten**, Darstellung der Mitosen 46.
„ Färbung der Leprabacillen 81.
**Beale**'s Karmin 38.
**Benda**'s Hämatoxylinfärbung 44.
**Beneke**, Fibrinfärbung, Modification 96.
**Bergamottöl** 34.
**Berliner** Blau 23.
**Biedert**, Sedimentirungsverfahren 79.
**Bilirubin** 105.
**Biondi**, Blutuntersuchung 94.
„ Färbung der Mitosen 45.
„ **-Heidenhain**'s Färbung 39.
**Birch-Hirschfeld**, Färbung von Amyloidpräparaten 51.
**Bismarckbraun** 38.
**Bizzozero-Vassale**, Färbung der Mitosen 45.
**Blackbleufärbung** der Achsencylinder 110.

**Blendung** 2.
**Blut**, Bakterien in demselben 96.
„ Bestandtheile, fremde in dems. 96.
„ Conservirung nach Hayem 90.
„ Conservirungsflüssigkeiten 89.
„ Deckglastrockenpräparate n. Ehrlich 90.
„ Deckglastrockenpräparate nach Hayem 90.
„ Deckglastrockenpräparate nach Nikiforoff 90.
„ Fixirung 89.
„ in Schnitten nach Biondi 89.
„ Untersuchung, frische 89.
„ Zusatzflüssigkeiten 89.
**Blutfarbstoff** 125. 126.
**Blutflecken**, Untersuchung 124. 125.
**Blutkörperchenzählung** 97.
**Blutplättchen** 94.
**Blutserum** 68.
**Blutuntersuchung** 89.
**Boeck**, Nachweis von Bakterien der Haut 102.
**Boehm**, Darstellung der Gallencapillaren 104.
„ Darstellung des Faserwerks der Leber 104.
**Boraxkarmin** 37.
„ zur Färbung der Nervensubstanz 109.
**Bostroem**, Aktinomycesfärbung 84.

## C.

**Camera** 3.
**Carbolfuchsin** 80.
**Carbolwasser** 58.
**Carbolxylol** 29. 34.
**Cedernholzöl** 34.
**Celloidineinbettung** 17.
**Celloidinparaffineinbettung** 21.
**Celloidinpräparate**, Serienschnitte 28.
**Cellulose**, Nachweis 50.
**Centralnervensystem** 107.
**Centrifugirungsverfahren** 7.
**Chlorpalladiumlösung** zur Entkalkung 16.
**Cholerabacillen** 82.
„ Nachweis im Darminhalt 82.
**Chromameisensäure** zur Darstellung von Mitosen 45.
**Chrompikrinsäure** 45.
**Chromsäure** zur Entkalkung 14.
„ „ Isolation 6.
„ „ Darstellung der Mitosen 45.
**Ciaglinski**, Achsencylinderfärbung 110.
**Coccidien** 87.
**Cochenillealaunlösung** 110.
**Cohnheim**, Goldmethode 121.
„ Injectionsflüssigkeit 23.
**Collodiumplatten** für Serienschnitte 28.
**Colloid** 49.
**Condensationswasser** 68.
**Condensor** 2.
**Cornea** 121.
**Corpora** amylacea 50.
**Curschmann**'sche Spiralen 106.
**Cylinderblendung** 3.
**Cylindermikrotome** 25.
**Cysticercus** cellulosae 87.
**Cystin** 105.
**Czaplewski**, Tuberkelbacillenfärbung 80.
**Czokor**'s Cochenillealaunlösung 110.

## D.

**Darm** 102.
**Darminhalt** 103.
**Darkschewitsch**, Methode für Serienschnitte 29.
**Deciduareste** 124. 128.
**Deckglas** 4.
**Deckglastrockenmethode** 58.
**Degeneration**, amyloide 49.
„ colloide 49.
„ fettige 48.
„ hyaline 51.
„ schleimige 49.
**Degenerative** Veränderungen, Untersuchung 47.
**Dermatophyten** 101.
**Diphtheriebacillus** 74.
**Diplococcus** pneumoniae 72.
**Doppelfärbung** 40.
**Doutrelepont**, Syphilisbacillen-Färbung 78.
**Drittelalkohol** 6.
**Drüsen**, Färbung 39.

## E.

**Ebner**'s Entkalkungsflüssigkeit 15.
**Echinococcus** 87.
**Ehrlich**, Blutuntersuchung 90. 91. 92.
„ Deckglastrockenpräparate von Blut 90.
„ Gentianaviolettlösung 45.
„ Hämatoxylinlösung, saure 35.
„ Hämatoxylineosinlösung 41.
„ Tuberkelbacillenfärbung 79.
**Einbettungsmethoden** 17.
**Einstichverfahren** zur Injection 24.
**Eisen**, Nachweis 52.
**Eisenchloridfärbung** des Nervensystems 121.
**Eiterkokken** 70.
**Eiweisslösung** zum Aufkleben von Paraffinschnitten 20.
**Elastische** Fasern, Darstellung 99. 100.
„ „ im Sputum 106.
**Endocarditis** 98.
**Entartung**, amyloide 49.
„ colloide 49.
„ fettige 48.
„ hyaline 51.
„ schleimige 49.
**Entkalkung** 14.
**Entzündungsversuch** 56.
**Eosin** 41.
**Eosinophile** Zellen 91.
**Erlicki**'sche Flüssigkeit 11.

**Erysipel**-Kokken 70.
**Esmarch**, Rollverfahren 70.
**Essigsäure** zur Untersuchung frischer Präparate 8.
**Exner**, Darstellung markhaltiger Nervenfasern 115.

## F.

**Färbetechnik**, Allgemeines 30.
„ frischer Präparate 9.
**Färbung** der Kerne 34.
„ diffuse 40.
„ doppelte 40.
„ frischer Präparate 9.
„ ganzer Stücke 42.
**Fasern**, elastische, Darstellung 98. 100.
„ „ im Sputum 106.
**Ferrocyankaliumreaction** auf Eisen 52.
**Fettreactionen** 48.
**Fibrin** 95.
**Flechsig-Golgi**, Darstellung der Ganglienzellenausläufer 118.
**Flemming**'s Säuregemisch 43. 48.
**Flormann**'s Aktinomycesfärbung 85.
**Fluorescin**, Entfärbung durch 59.
**Flüssigkeiten**, Untersuchung 7.
**Fol**'s Entkalkungsflüssigkeit 15.
„ Fixirungsflüssigkeit 45.
**Formalin** 12.
**Fränkel, C.**, Schimmelpilzuntersuchung 85.
**Freud**, Goldfärbung der Achsencylinder 111.
**Friedländer**'s Kapselbacillus 72.
**Fuchsinessigsäure** 8.
**Fuchsinfärbung** der Bakterien nach Pfeiffer 62.

## G.

**Gabbet**, Tuberkelbacillenfärbung 80.
**Gallencapillaren**, Darstellung 104.
**Gallenfarbstoff**, Conservirung 103.
**Ganglienzellen**, Färbung 108. 116.
**Gefässe**, Untersuchung 98.
**Gefriermikrotom** 27.
**Gehörorgan** 122.
**Geisseln** der Bakterien 61.
**Gelatine** 67.
**Gelatineculturen**, Conservirung durch Formalin 64.
„ Schnittpräparate davon 64.
**Gentianaviolett**, Bakterienfärbung 62.
„ Kernfärbung 38.
**Gentianaviolettlösung** von Ehrlich 45.
**Geschlechtsorgane**, Untersuchung 124.
**Geschwülste**, Untersuchung 54.
**Gewebe**, kollagenes 100.
**Giacomi**, Syphilisbacillenfärbung 78.
**Gieson, van**, Färbungsmethode 41.
**Glasgegenstände** 4.
**Glasnadeln** 4.
**Gliafasern**, Darstellung 119.
**Glykogen**, Nachweis 51.
**Glyzerin** zur Untersuchung frischer Präparate 7.
**Glyzerin** zur Einlegung von Schnitten 32.
**Glyzerinagar** 67.
**Glyzeringelatine** zum Aufkleb. auf Kork 26.
**Goldfärbung** von Cohnheim 121.
„ von Freud 111.
„ von Upson 111.
**Golgi**, Silbermethode für Ganglienzellen 116.
„ Sublimatmethode für Ganglienzellen 117.
**Golgi-Flechsig**, Methode zur Darstellung der Ganglienzellenausläufer 118.
**Gonokokken** 71.
„ Züchtung 68. 71.
**Gram**'sche Färbung für Bakterien 60. 63.
„ „ „ Mitosen 46.
**Granulationen** der weissen Blutzellen 91 ff.
**Grenacher**'s Karmin 92.
**Gudden**'s Mikrotom 26.
„ Umgiessungsmasse 27.
**Gummicollodiumplatten** f. Serienschnitte 28.
**Gummiglyzerin** 13.

## H.

**Haare**, Untersuchung 126.
**Hämatin**, salzsaures 126.
**Hämatoidin** 52.
**Hämatoxylineosinfärbung** v. Amyloid 51.
**Hämatoxylineosinlösung** von Ehrlich 41.
**Hämatoxylinfärbung** 34.
„ Doppelfärbung mit Eosin 41.
„ Doppelfurbung mit Karmin 40.
„ nach Apathy 36.
„ „ Benda 45.
„ „ Ehrlich 35.
„ „ Heidenhain 36.
„ „ Kulschitzky f. das Centralnervensystem 115.
„ „ Weigert für das Centralnervensystem 112. 113.
**Häminkrystalle** 126.
**Hämoglobin**, Fixirung 90.
**Hämosiderine**, Nachweis 52.
**Härtungsmethoden** 9.
**Harn** 105.
**Harnapparat** 104.
**Harncylinder** 105.
**Harnsäure** 105.
**Häute**, seröse 99.
**Haut** 99.
**Hefe**, Untersuchung 86.
**Heidenhain-Biondi**, Färbung 39.
„ „ „ der Mitosen 45.
**Hermann**, Fixirungsflüssigkeit 44.

**Herxheimer**, Darstellung der elastischen Fasern 99.
**Herz**, Untersuchung 98.
**Hohlspiegel** 1.
**Hollundermark** zum Einbetten 21.
**Holzessig**, Entkalkung 15.
**Honegger**, Karmin, neutrales 40.
**Hopfenöl** 34.
**Hoyer**, Mucinfärbung 49.
**Hyalin** 51.

I.

**Immersionslinsen** 1. 2.
**Imprägnation** mit Kalksalzen 52.
**Injection** der Lymphgefässe 24.
**Injectionsverfahren** 22.
**Irisblende** 3.
**Jodgrünreaction** auf Amyloid 51.
**Jodlösung** 8.
**Jodreaction** auf Amyloid 50.
„ „ Corpora amylacea 50.
„ „ Glykogen 51.
„ „ Stärkekörner 50.
**Jodschwefelsäurereaction** auf Amyloid 49.
„ „ Cellulose 50.
**Isolationsflüssigkeiten** 6.

K.

**Kali** aceticum zur Untersuchung frischer Präparate 8.
„ „ zur Aufbewahrung von Schnitten 33.
**Kalilauge** 6. 8.
„ Verstärkung der Färbekraft durch Zusatz von 58.
**Kalk**, kohlensaurer 105.
„ phosphorsaurer 105.
**Kalksalze**, Imprägnation 52.
**Kanadabalsam** 33.
**Kapselbacillus** von Friedländer 72.
**Karmin** von Beale 38.
„ neutrales 40.
„ „ zur Färbung des Nervengewebes 109.
**Kartoffel** als Nährboden 68.
**Käse**, als Einbettungsmittel 21.
**Kernfärbungen** 34.
**Kerntheilungsfiguren** 43.
**Knochenmark**, Untersuchung 98.
**Knochensystem**, Untersuchung 122.
„ Färbung nach Pommer 123.
„ Färbung nach Scheffer 123.
„ Schliffe 124.
**Kochmethode** zur Härtung 13.
**Kochsalzlösung** 5.
**Kollmann**'s Injectionsmasse 23.
**Kolloid** 49.
**Kork**, Aufkleben von Stücken auf denselben 26.
**Kühne**'s Methylenblaufärbung 63.
**Kulschitzky**, Färbung der Nervenfasern 115.
„ Gliafasern. Darstellung 119.

L.

**Lampe** zum Mikroskopiren 3.
**Langhans**, Nachweis von Glykogen 52.
**Lavendelöl** 34.
**Lävulose** zur Conservirung von Schnitten 50.
**Leber** 103.
**Leim**, flüssiger, zum Aufkleben auf Kork 26.
**Leiminjectionsmassen** 23.
**Leonhardi**'sche Tinte 50.
**Leprabacillus** 81.
**Leucin** 105.
**Leukocyten**, mononucleäre 90.
„ polynucleäre 91.
„ eosinophile 92.
**Lithionkarmin** 36.
**Löffler**'s Methylenblau 59.
„ Färbung von Bakterienschnittpräparaten 62.
„ Färbung der Geisseln und Wimperhaare der Bakterien 61.
**Lugol**'sche Lösung 8.
**Lunge** 106.
**Lupe** 4.
**Lustgarten**, Syphilisbacillenfärbung 77.
**Lymphdrüsen** 98.
**Lymphgefässe**, Injection 24.
**Lymphocyten** 90.

M.

**Macerationsflüssigkeiten** 6.
**Malariaplasmodien** 87.
**Mallory**, Färbung der Achsencylinder 108.
**Manchot**, Darstellung der elastischen Fasern 100.
**Marchi**, Untersuchungsmethode des Centralnervensystems 107.
**Markscheidenfärbung** 110. 112.
**Maskenlack** 33.
**Mastzellen** 55. 101.
**Mäuseseptikämie**, Bacillus 76.
**Mays**, Nervenendigung 120.
**Metallinstrumente** 4.
**Methylenblaufärbung** von Kühne 63.
„ „ Löffler 59.
**Methylenblauinjection** zur Darstellung der peripheren Nerven 120.
**Methylgrünreaction** auf Amyloid 50.
**Methylviolettreaction** auf Amyloid 50.
**Mikroskope** 1. 2.
**Mikroskopirlampen** 3.
**Mikrotome** 24.
**Milch** als Nährboden 68.
**Milchsäure**, Entkalkung 15.
**Milz**, Untersuchung 98.
**Milzbrandbacillen** 73.
**Möller**, Sporenfärbung 65.
**Mucin**, Färbung 49.
**Müller**'sche Flüssigkeit 10.
**Muskel**, Untersuchung 124.
**Muskeltrichine** 86.

## N.

**Nährböden** für Bakterien 67.
**Nährbouillon** 67.
**Natron**, harnsaures 105.
**Natronlauge** 8.
**Natron**, saures harnsaures 105.
**Neisser**, Schnittpräparate von Gelatineculturen 64.
**Nekrose** 47.
**Nelkenöl** 34.
**Nervensystem**, centrales 107.
„ peripheres 120.
**Nigrosinfärbung** der Achsencylinder 112.
**Nikiforoff**, Deckglastrockenpräparate von Blut 90.
„ Färbung drüsiger Organe 39.
„ Nervenfärbung 116.
„ Recurrensspirillen, Färbung 82.
**Nissl**, Färbung der Ganglienzellen 108.

## O.

**Objectivlinse** 1.
**Objectträger** 4.
**Obregia**, Modification der Golgi'schen Methode 117.
**Ocular** 1.
**Ocularmikrometer** 3.
**Oelimmersion** 1.
**Oedem**, malignes 73.
**Oppel**, Darstellung des Faserwerks der Leber 104.
**Orceinfärbung** des Aktinomyces 84.
**Origanumöl** 34.
**Orseillefärbung** des Aktinomyces 84.
**Osmiummethode** von Exner für markhaltige Nervenfasern 115.
**Osmiumsäure**, als Härtungsflüssigkeit 13.
„ als Isolationsflüssigkeit 6.
„ als Zusatzflüssigkeit 6.
„ als Zusatz zu Entkalkungsflüssigkeiten 15.

## P.

**Pacini**'sche Flüssigkeit 125.
**Pal**, Färbung markhaltiger Nervenfasern 114.
**Pankreas**, Untersuchung 103.
**Pankreasextract** 30.
**Paraffincelloidineinbettung** 21.
**Paraffineinbettung** 19. 25.
**Paraffinpräparate**, Serienschnitte 29.
**Parasiten**, thierische 86.
**Petri**'sche Schalen 70.
**Phloroglucinmethode** zur Entkalkung 16.
**Pigmentatrophie** 47.
**Pigmentbildung** 52.
**Pikrinsäure**, Doppelfärbung 41.
„ Entkalkung 15.
„ Härtung 12.
**Pikrokarmin** 37.
**Pikrolithionkarmin** 38.
**Pinselverfahren** für Schnitte 30.
**Placentarrest**, Untersuchung 124.
**Planspiegel** 1.
**Plasmazellen** 101.
**Plasmodien** 87.
**Platner**, Eisenchloridfärbung des Nervensystems 121.
**Plattenculturverfahren** 69.
**Pneumoniecoccus** 72.
**Pommer**, Knochenfärbung 123.
**Präparate**, frische, Untersuchung 6.
„ „ Färbung 9.
**Präparirnadel** 5.
**Protozoen** 87.

## Q.

**Quincke**, Nachweis von Eisen 54.

## R.

**Rabl**'s Chromameisensäure 45.
**Ramon y Cajal**, Darstellung der Nervenfasern 117.
**Rasirmesser** 24.
**Rauschbrandbacillus** 75.
**Reagentien** für Untersuchung frischer Präparate 7.
**Recurrensspirillen** 82. 97.
**Respirationsapparat** 106.
**Revolverapparat** 3.
**Rhinosklerombacillen** 74.
**Rindfleisch**, Blutuntersuchung 94.
**Rotzbacillen** 75.
**Roussin**, Untersuchungsflüssigkeit für Blut 125.
**Russel**, Darstellung der Zelleinschlüsse 47.

## S.

**Saffraninfärbung** 41.
„ d. Centralnervensystems nach Adamkiewicz 115.
„ d. Centralnervensystems nach Adamkiewicz-Nikiforoff 116.
**Sahli**, Nervenfärbung 110.
**Salpetersäure** zur Entkalkung 16.
**Salzsäure** als Zusatzflüssigkeit 9.
„ zur Entkalkung 15.
**Salzsäurespiritus** 36.
**Samenflecke**, Untersuchung 127.
**Sarcina** ventriculi 73.
**Scheffer**, Knochenfärbung 123.
**Scheibenblendung** 2.
**Schellacklösung** zum Aufkleben von Paraffinschnitten 20.
**Schimmelpilze** 85.
**Schleimbeutel** 124.
**Schleimhäute** 102.
**Schleimige** Entartung 49.
**Schlittenmikrotom** 25.
**Schmaus**, Achsencylinderfärbung 110.
**Schnitte**, Anfertigung 24.
„ Aufbewahrung in Glyzerin 32.
„ „ „ Kali aceticum 33.
„ „ „ Kanadabalsam 33.

**Schnitte**, Auspinselung 30.
„ Ausschüttelung 30.
„ Entwässerung 33.
„ Färbung 30.
„ von Gelatineculturen 64.
„ in Serien 28.
„ Verdauung, künstliche 30.
**Schnittstrecker** 26.
**Schottelius**, Nachweis von Cholerabakterien im Darminhalt 82.
**Schusterkugel** 3.
**Schüttelmethode** für Schnitte 30.
**Schütz**, Gonokokkenfärbung 71.
**Schwefelammoniumreaction** auf Eisen 53.
**Schweinerothlauf**, Bacillus 76.
**Schwellung**, trübe 48.
**Sedimentirungsverfahren** zum Nachweis der Tuberkelbacillen 79.
**Sehnen**, Untersuchung 124.
**Sehnenscheiden**, Untersuchung 124.
**Sehorgan** 121.
**Serienschnitte** 28.
**Serum**, künstliches 5.
**Sharpey**'sche Fasern 123.
**Siebdosen** von Steinacher 4.
**Silbermethode** für Ganglienzellen 116.
**Spatel** 5.
**Spermatozoen**, Färbung 128.
**Spiralen**, Curschmann'sche 106.
**Sporenfärbung** 65.
**Sprosspilze** 85.
**Sputum** 106.
„ Sedimentirungsverfahren 79.
**Stabylit** zum Aufkleben von Celloidinpräparaten 18.
**Staphylococcus** pyogenes 70.
**Stärkekörner**, Nachweis 50.
**Steinacher**'s Siebdosen 4.
**Sterilisation** 66.
**Stieda**, Nachweis von Eisen 52.
**Strasser**'s Methode für Serienschnitte 29.
**Streptococcus** erysipelatis 71.
„ pyogenes 70. 71.
**Ströbe**, Achsencylinderfärbung 110.
**Stroschein**, Sedimentirungsverfahren 79
**Stückfärbung** 42.
**Sublimat** zur Darstellung der Ganglienzellenausläufer 117.
„ zur Darstellung der Mitosen 45.
„ zur Härtung 11.
**Syphilisbacillen** 77.

## T.

**Tänzer**, Fasern, elastische 100.
**Teichmann**'sche Krystalle 126.
**Terpentinöl** 33.
**Tetanusbacillus** 75.
**Thiersch**'s Injectionsmasse 23.
**Thionin**, zur Färbung des Mucins 49.
**Thoma**'s Entkalkungsmethode 17.
**Thoma-Zeiss**, Zählapparat 97.
**Thoison**'s Verdünnungsflüssigkeit 97.
**Trichine** 86.
**Tripelphosphat** 105.
**Trockenmethode** Unna's für Schnitte 64.
**Tropaeolin**, Entfärbung durch 59.
**Trypsinlösung** zur künstl. Verdauung 30.
**Tuberkelbacillen** 78.
**Typhusbacillen** 77.
**Tyrosin** 105.

## U.

**Uhrschale** 4.
**Unger**, Färbung der Spermatozoen 128.
**Unna**, Bakterien der Haut 102.
„ Darstellung der elastischen Fasern 99. 100.
„ Darstellung des kollagenen Gewebes 100.
„ Darstellung der Plasmazellen 101.
„ Trockenmethode für Schnittpräparate 64.
**Untersuchung**, frische, von Geweben 5.
**Upson**, Goldfärbung d. Achsencylinder 111.
**Utensilien** zum Mikroskopiren 4.
**Uterusschleimhaut**, Untersuchung 124.

## V.

**Vassale**, Modification der Weigert'schen Nervenfärbung 114.
**Verdauung**, künstliche 30.
**Vesuvin** siehe Bismarckbraun.

## W.

**Wachsumrandung** 32.
**Waldeyer**'s Chromsäuremethode zur Entkalkung 15.
„ Chlorpalladiumlösung zur Entkalkung 16.
**Wasserimmersion** 1.
**Weigert**'s Aktinomycesfärbung 84.
„ Bakterienfärbung 63.
„ Fibrinfärbung 95.
„ Markscheidenfärbung der Nervenfasern 112. 113.
„ Methode der Serienschnitte 28.
„ Pikrokarmin 37.
**Wolters**, Achsencylinderfärbung 119.
**Wuchernde** Gewebe, Untersuchung 54.

## X. Y. Z.

**Xylol** 29.
**Xylolcarbol**, zur Aufhellung 29. 34.
**Zählapparat** für Blutkörperchen 97.
**Zalefski**, Eisennachweis 53.
**Zeichenapparat** 4.
**Zelleinschlüsse**, Darstellung n. Altmann 46.
„ Darstellung n. Russel 47.
**Zellen**, eosinophile 91.
**Zenker**'sche Härtungsflüssigkeit 11.
**Zerzupfungsverfahren** 5. 6.
**Ziehl-Neelsen**, Tuberkelbacillenfärbung 80.
**Zuckersyrup** zur Conservirung von Schnitten 50.

Lippert & Co. (G. Pätz'sche Buchdr.), Naumburg a. S.